

009983972 **Image available**

WPI Acc No: 1994-251683/199431

Beta-galactosyl-transferase DNA and protein - useful for prodn. of
saccharide chains

Patent Assignee: KYOWA HAKKO KOGYO KK (KYOW)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6181759	A	19940705	JP 92336436	A	19921216	199431 B
JP 3170369	B2	20010528	JP 92336436	A	19921216	200132

Priority Applications (No Type Date): JP 92336436 A 19921216

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6181759	A	47	C12N-009/10		
JP 3170369	B2	47	C12N-015/09		Previous Publ. patent JP 6181759

Abstract (Basic): JP 6181759 A

Beta-galactosyltransferase expressed by a gene cloned from animal
cells is new.

Also claimed are (1) DNA encoding the above enzyme; (2) methods for
detection and suppressed production of the above enzyme; (3)
recombinant vector incorporating the above DNA; and (4) cells
containing the above vector and their production method.

USE - The above enzyme can be used for production of
physiologically active saccharide chains and variants and for
improvement of saccharide chains bound to physiologically active
proteins.

In an example, vector pAMoERSA was constructed for expression of
arbitrary proteins as fused proteins with the region where IgC can bind
to protein A and Staphylococcus aureus. Plasmid pAMoERSAW1 was
constructed from pAMoERSA and a DNA fragment encoding the catalytic
site of beta-1,3-galactosyltransferase. pAMoPRWM1 expressing
beta-1,3-galactosyltransferase was introduced into KJM-1 cells. The
product, sialyl Lewis-a saccharide chain, could be detected by an
indirect fluorescence antibody staining, using KM 231, an antibody
against sialyl Lewis-a saccharide chain. Compared with a control
vector, pAMoPRWM1 could express beta-1,3-galactosyltransferase more
strongly.

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-009/10; C12N-015/09

International Patent Class (Additional): A61K-031/70; C12N-001/21;
C12N-005/10; C12N-015/54; C12P-019/18; C12Q-001/68; C12R-001-19;
C12N-009/10; C12R-001-91

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平 6 - 1 8 1 7 5 9

(43)公開日 平成6年(1994)7月5日

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/10	Z N A	9359-4 B		
A 6 1 K 31/70	A E D	8314-4 C		
C 1 2 N 1/21		7236-4 B		
15/54				
		9050-4 B	C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求	請求項の数 2 3			(全 4 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-336436

(22)出願日 平成4年(1992)12月16日

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 佐々木 克敏

東京都町田市本町田1171-3-201

(72)発明者 佐々木 悦代

東京都町田市本町田1171-3-201

(72)発明者 川島 薫

神奈川県川崎市高津区諏訪1153-712

(72)発明者 花井 陳雄

神奈川県相模原市富士見3-3-3-202

(72)発明者 西 達也

東京都町田市中町3-9-13

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 β 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ

(57)【要約】

【構成】 動物細胞からクローン化された遺伝子により発現される新規 β 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、該 β 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNA、該DNAを用いる β 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼの検出および生産の抑制方法、該DNAが組み込まれた組換え体ベクターおよび該組換え体ベクターを含有する細胞ならびにそれらの製造法。

【効果】 本発明の β 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、有用生理活性を有する糖鎖とその修飾物の製造および有用生理活性タンパク質に結合している糖鎖の改良に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2記載のアミノ酸配列を有する β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ。

【請求項2】 請求項1記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAまたは該cDNAと相同性を有するDNA。

【請求項3】 配列番号1記載の塩基配列を有するDNA。

【請求項4】 請求項2記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAが組み込まれた組換え体ベクター。

【請求項5】 配列表1記載の塩基配列を有するDNAが組み込まれた組換え体ベクター。

【請求項6】 動物細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを発現クローニングベクターに組み込むことによりcDNAライブラリーを構築し、該cDNAライブラリーを細胞に導入し、得られる細胞を、その細胞の増殖を抑制する活性を有するレクチンの存在下で培養し、増殖する細胞を単離し、該細胞より β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを採取することを特徴とする請求項2または3記載のDNAの製造法。

【請求項7】 動物細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを発現クローニングベクターに組み込むことによりcDNAライブラリーを構築し、該cDNAライブラリーを細胞に導入し、得られる細胞を、その細胞の増殖を抑制する活性を有するレクチンの存在下で培養し、増殖する細胞を単離し、該細胞より β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAをベクター中のプロモーターの下流に導入することを中心とする請求項4または5記載の組換え体ベクターの製造法。

【請求項8】 請求項4または5記載の組換え体ベクターを保有する細胞を培地に培養し、培養物中に β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを生成蓄積させ、該培養物から β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする請求項1記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの製造法。

【請求項9】 動物細胞がヒト・メラノーマWM266-4細胞である請求項6記載のcDNAの製造法。

【請求項10】 動物細胞がヒト・メラノーマWM266-4細胞である請求項7記載の組換え体ベクターの製造法。

【請求項11】 レクチンがヒマメレクチン120である請求項6記載のDNAの製造法。

【請求項12】 レクチンがヒマメレクチン120である請求項7記載の組換え体ベクターの製造法。

【請求項13】 プラスミドpUC119-WM1。

【請求項14】 請求項4または5記載の組換え体ベクターを含有する細胞。

【請求項15】 請求項14記載の細胞を用いて糖タン

パク質または糖脂質に含まれるN-アセチルグルコサミンに β 1 \rightarrow 3結合でガラクトースを付与する方法。

【請求項16】 α 2,3-シアリルトランスフェラーゼおよび α 1,3/1,4-フコシルトランスフェラーゼ存在下、請求項14記載の細胞を用いて糖タンパク質または糖脂質の糖鎖上にルイスa (Lewis-a) またはシアリル・ルイスa (Sialyl-Lewis-a) 構造を導入する方法。

【請求項17】 請求項1記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いて糖タンパク質または糖脂質に含まれるN-アセチルグルコサミンに β 1 \rightarrow 3結合でガラクトースを付与する方法。

【請求項18】 α 2,3-シアリルトランスフェラーゼおよび α 1,3/1,4-フコシルトランスフェラーゼ存在下、請求項1記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いて糖タンパク質または糖脂質の糖鎖上にルイスa (Lewis-a) またはシアリル・ルイスa (Sialyl-Lewis-a) 構造を導入する方法。

【請求項19】 請求項2または3記載のDNAを用いるハイブリダイゼーション法により、請求項1記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを検出する方法。

【請求項20】 請求項2または3記載のDNAを用いるポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、請求項1記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを検出する方法。

【請求項21】 請求項2または3記載のcDNAの塩基配列の一部または全部を含むオリゴヌクレオチドを用いて、請求項1記載の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの生産を抑制する方法。

【請求項22】 請求項4または5記載の組換え体ベクターを含有する大腸菌。

【請求項23】 *Escherichia coli* HB101/pUC119-WM1 (FERM BP-4011)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクターおよび該組換え体ベクターを含有する細胞ならびにそれらの製造法に関する。さらに、該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いる糖鎖の製造法および該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを形質転換細胞内に生産させることによる糖鎖の製造法に関する。また、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAを用いる該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの検出方法および生産の抑制方法に関する。本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、有用生理活性を有する糖鎖とその修飾物の製造および有用生理活性タンパク質に結合している糖鎖の改良に有用である。

【0002】

【従来の技術】大腸菌などの原核生物によって生産されるタンパク質が糖鎖を有していないのに対し、酵母、カビ、植物細胞、動物細胞等の真核生物によって生産されるタンパク質および脂質には糖鎖が結合している場合が多い。動物細胞の糖鎖としては、タンパク質に付加するものとして、タンパク質中のアスパラギン (Asn) 残基に結合するN-グリコシド結合型糖鎖 (N-グリカンとも呼ばれる)、およびセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) 残基に結合するO-グリコシド結合型糖鎖 (O-グリカンとも呼ばれる) が知られている。最近、数多くのタンパク質には糖鎖を含むある種の脂質が共有結合しており、この脂質を介してそれらのタンパク質は細胞膜に付着していることが明らかとなった。糖鎖を含むこの脂質はグリコシル・ホスファチジルイノシトール・アンカー (glycosyl phosphatidylinositol anchor) と呼ばれる。他に、動物細胞の糖鎖としては、グリコサミノグリカン (Glycosaminoglycan) があげられる。タンパク質とグリコサミノグリカンが共有結合している化合物はプロテオグリカン (proteoglycan) と呼ばれる。プロテオグリカンの糖鎖を構成するグリコサミノグリカンは、糖タンパク質糖鎖であるO-グリカンと構造が類似しているが化学的には異なっている。グリコサミノグリカンは、グルコサミン (glucosamine) またはガラクトサミン (galactosamine) とウロン酸〔但し、ケラタン硫酸 (keratan sulfate) はウロン酸を有していない〕を含む2糖単位の繰り返し構造から成り、硫酸基が共有結合している〔但し、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid) は硫酸基を有していない〕という特徴を有している。さらに、動物細胞の糖鎖として、糖脂質 (glycolipid) と呼ばれる物質に含まれる糖鎖が挙げられる。動物細胞の糖脂質としては、糖と長鎖脂肪酸と長鎖塩基であるスフィンゴシン (sphingosine) が共有結合したスフィンゴ糖脂質 (sphingoglycolipid) と、糖鎖がグリセロールに共有結合したグリセロ糖脂質 (glyceroglycolipid) とが知られている。

——【0003】最近、糖鎖の機能については分子生物学や細胞生物学の進歩とともに急速に解明が進んでおり、現在までに糖鎖の多様な機能が明らかにされてきている

〔西および伊藤 (Nishi and Itoh): トレンズ・イン・グライコサイエンス・アンド・グライコテクノロジー (Trends in Glycoscience and Glycotechnology), 4, 336-344 (1992)〕。まず、血中における糖タンパク質のクリアランスに糖鎖は重要な役割を果たしている。大腸菌に遺伝子を移入して作られたエリスロポイエチン (erythropoietin) は、生体外 (in vitro) では活性を示すが、生体内 (in vivo) では急速にクリアランス (clearance) されることが知られている〔ドーダル (Dordal) ら: エンドクリノーロジー (Endocrinology), 116, 2293 (1985) およびブローネ (Browne) ら: コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・クアンティタティブ・バイ

オロジー (Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.), 51, 693 (1986)〕。またヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (human granulocyte-macrophage colony stimulating factor; hGM-CSF) は、天然ではN-グリコシド結合型糖鎖を2本持っているが、糖鎖の本数を減らすとそれに比例してラット血漿中でのクリアランス速度が速まることが知られている〔ドナヒュー (Donahue) ら: コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・クアンティタティブ・バイオロジー (Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.), 51, 685 (1986)〕。クリアランスの速度およびクリアランスされる部位は糖鎖の構造によっても変化し、シアル酸がついたhGM-CSFは腎臓でクリアランスされるのに対し、シアル酸を除去したhGM-CSFはクリアランス速度が速まり、肝臓でクリアランスされることが知られている。また、ラット肝初代培養の系で各種のN-グリコシド型糖鎖生合成阻害剤存在下に生合成された糖鎖構造の異なる α 1-acid glycoprotein について、ラットの血漿中でのクリアランス速度及びラット灌流液中でのクリアランス速度を調べたところ、どちらの場合も、高マンノース型、糖鎖欠損型、ハイブリッド型、複合型 (天然型) の順でクリアランス速度が遅くなった。また、血栓溶解剤としてすでに医薬品として用いられている組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA; tissue-type plasminogen activator) の血中でのクリアランスもその糖鎖の構造が大きく影響を与えることが知られている。

【0004】糖鎖がタンパク質にプロテアーゼ抵抗性を付与することが知られており、例えば、フィブロネクチン (fibronectin) の糖鎖形成をツニカマイシンで阻害すると、得られた糖鎖欠損フィブロネクチンの細胞内タンパク質の分解の速度が増進する。糖鎖の付加により、熱安定性や抗凍結性が増大することも知られている。また、エリスロポイエチンや β -インターフェロンなどにおいては、タンパク質の溶解性の増大に糖鎖が寄与していることが知られている。

【0005】糖鎖は、タンパク質が正しい立体構造を保持するのにも役立っている。水泡性口内炎ウイルスの膜結合糖タンパク質の天然に存在する2本のN-グリコシド結合型糖鎖を除去すると、タンパク質の細胞表面への輸送が阻害されるが、そのタンパク質に新たな糖鎖が付加されるとそれが回復することが知られている。この場合、糖鎖の除去により、ジスルフィド結合によるタンパク質分子間の会合が誘起され、その結果タンパク質の輸送が阻害されることが明らかとなった。また新たに糖鎖を付加すると、この会合が阻害されることによりタンパク質の正しい立体構造が保持されるため、タンパク質の輸送が可能になる。また、その際新たな糖鎖が付加される位置については、かなりの融通性があることが示されている。またその反面、導入される位置によっては天然の糖鎖を有するタンパク質の輸送をも完全に阻害する場

合があることも明らかとなった。

【0006】糖鎖がポリペプチド上の抗原部位をマスクしている例も知られている。hGM-CSF、プロラクチン(prolactin)、インターフェロン- γ 、ラウシャー(Rauscher)白血病ウィルスgp70およびインフルエンザヘマグルチニン(influenza hemagglutinin)において、ポリクローナル抗体またはペプチド上の特定の領域に対する単クローナル抗体を用いた実験から、これらタンパクの糖鎖が、抗体との反応を阻害していると考えられている。また、糖鎖自身が糖タンパク質の活性発現に直接か

かわっている場合があることも知られており、例えば、黄体形成ホルモン、濾胞刺激ホルモン、絨毛性腺刺激ホルモン等のような糖タンパク質ホルモンの活性発現に糖鎖が関与していると考えられている。

【0007】糖鎖の重要な機能として、糖鎖が、細胞間、タンパク質間または細胞とタンパク質間の認識現象に関与していることが挙げられる。例えば、糖鎖の構造の違いにより生体内でクリアランスされる場所が異なることが知られている。最近、炎症反応に対し特異的に血管内皮細胞上に発現し、好中球との接着を促すタンパク質ELAM-1のリガンドがシアリル・ルイスX(Sialyl-Lewis-X)と呼ばれる糖鎖[NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, NeuAc : シアル酸; Gal : ガラクトース; Fuc : フコース; GlcNAc : N-アセチルグルコサミン]であることが判明し、糖鎖自体あるいは糖鎖の修飾物が医薬品などに利用できる可能性が出てきた〔フィリップス(Phillips)ら:サイエンス(Science),250, 1130 (1990)、ゲルツ(Goelz)ら:トレンドズ・イン・グライコサイエンス・アンド・グライコテクノロジー(Trends in Glycoscience and Glycotechnology), 4, 14-24 (1992)〕。さらに、一部のTリンパ球や好中球に発現しているL-セレクトリン(L-selectin)や炎症刺激によって血小板や血管内皮細胞の膜表面に発現するGMP-140 (P-セレクトリンとも呼ぶ)はELAM-1と同じく炎症反応に関係しており、それらのリガンドもELAM-1のリガンドであるシアリル・ルイスX糖鎖に類似した糖鎖であることが示唆されている〔ローゼン(Rosen)ら:トレンドズ・イン・グライコサイエンス・アンド・グライコテクノロジー(Trends in Glycoscience and Glycotechnology), 4, 1-13 (1992)、ラーセン(Larsen)ら:トレンドズ・イン・グライコサイエンス・アンド・グライコテクノロジー(Trends in Glycoscience and Glycotechnology), 4, 25-31 (1992)、アルフォ(Aruffo)ら:トレンドズ・イン・グライコサイエンス・アンド・グライコテクノロジー(Trends in Glycoscience and Glycotechnology), 4, 146-151 (1992)〕。

【0008】炎症反応と同様に、癌の転移においても、ELAM-1やGMP-140は癌細胞の血管内壁への接着や癌細胞と血小板との凝集を引き起こすことにより癌転移を促進していることが示唆されている〔ゲルツ(Goelz)ら:ト

レンズ・イン・グライコサイエンス・アンド・グライコテクノロジー(Trends in Glycoscience and Glycotechnology), 4, 14-24 (1992)、ラーセン(Larsen)ら:トレンドズ・イン・グライコサイエンス・アンド・グライコテクノロジー(Trends in Glycoscience and Glycotechnology), 4, 25-31 (1992)、神奈木(Kannagi)および高田(Takada):実験医学(Experimental Medicine), 10, 96-107 (1992)〕。このことは転移能の高い癌細胞ではシアリル・ルイスX糖鎖の発現量が高いという知見とも符合する〔入村(Irimura)ら:実験医学(Experimental Medicine), 6, 33-39 (1988)〕。シアリル・ルイスa(Sialyl-Lewis-a)と呼ばれる糖鎖[NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, NeuAc : シアル酸; Gal : ガラクトース; Fuc : フコース; GlcNAc : N-アセチルグルコサミン]も癌の悪性度との相関関係が報告されている〔神奈木(Kannagi)および高田(Takada):実験医学(Experimental Medicine), 10, 96-107 (1992)〕。セレクトリン族遺伝子の中で少なくともELAM-1はシアリル・ルイスa糖鎖と強く結合することが知られている〔バーグ(Berg)ら:ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 265, 14869-14872 (1991)、高田(Takada)ら:バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysical Research Communications), 179, 713-719 (1991)、ラーキン(Larkin)ら:ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267, 13661-13668 (1992)〕。ELAM-1のシアリル・ルイスa糖鎖に対する親和性はシアリル・ルイスX糖鎖に対する親和性よりもむしろ高いことが報告されている〔バーグ(Berg)ら:ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 265, 14869-14872 (1991)〕。

【0009】これらの知見から、シアリル・ルイスa糖鎖、シアリル・ルイスX糖鎖、およびそれらの誘導体は、ELAM-1、L-セレクトリンまたはGMP-140に結合することにより優れた抗炎症効果を発揮すること、および癌転移が抑制されることが期待される。上述の炎症反応と癌転移の機構を考慮すると、ELAM-1、L-セレクトリン、GMP-140が認識するリガンド糖鎖の合成をつかさどる糖転移酵素の発現を抑制することによっても炎症反応を抑制したり、癌転移を防止できることが期待される。ある特定の遺伝子の発現を抑制するには、アンチセンスRNA/アンチセンスDNA技術〔徳久(Tokuhisa):バイオサイエンスとインダストリー,50, 322-326 (1992)、村上(Murakami):化学,46, 681-684 (1991)〕またはトリプル・ヘリックス(Triple helix)技術〔チュブ(Chubb)とホーガン(Hogan):トレンドズ・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 10, 132-136 (1992)〕が有用である。このアンチセンスRNA/DNA技術を用いて所望の糖転移酵素の発現を抑制するには、

その遺伝子あるいは遺伝子の塩基配列情報が必要であるため、所望の糖転移酵素の遺伝子をクローン化すること、およびその塩基配列情報を解析することは重要である。

【0010】さらに、炎症性白血球や癌細胞での特定の糖転移酵素の発現を調べることにより、炎症性疾患や癌の悪性度を診断することもできる。所望の糖転移酵素遺伝子の発現を調べるには、該遺伝子を放射能などで標識したものをプローブとするノーザンハイブリダイゼーション法〔サンプブルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch) 10、マニアチス(Maniatis) (モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊) やポリメラーゼ・チェーン・リアクション法(以下、PCR法と略記する)〔イニス(Innis)ら: PCRプロトコールズ(PCR Protocols)、アカデミック・プレス(Academic Press)、1990年刊)が有用である。これらの手法を適用するには、所望の糖転移酵素遺伝子あるいは遺伝子の塩基配列情報が必要である。この点からも、所望の糖転移酵素の遺伝子をクローン化すること、およびその塩基配列情報を解析することは重要である。

【0011】特開平2-227075に顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF; granulocyte colony-stimulating factor)やプロウロキナーゼ(pro-UK; pro-urokinase)等の有用生理活性タンパク質に、組換えDNA技術を用いて人為的にかつ意図的に糖鎖を導入することにより、これらのタンパク質の性質を改善することができることが開示されている。

【0012】以上のように、糖タンパク質の糖鎖の構造を改変したり、特定の糖鎖あるいはその修飾物を大量に調製することは産業上重要な課題である。糖鎖の構造を改変する手段については近年著しく進展している。特に糖鎖を逐次解離してゆく特異性の高い酵素(エキソグリコシダーゼ)やペプチド鎖との結合点をペプチド鎖と糖鎖の双方を変化させずに解裂させるグリコペプチダーゼやエンド型グリコシダーゼによって、糖鎖の構造を改変させることができ、糖鎖の生物学的な役割についても詳細な研究ができるようになった。さらに、最近、糖脂質の糖鎖とセラミドの間を開裂するエンドグリコセラミダーゼ(endoglycoceramidase)が見いだされ〔伊東と山形: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 261, 14278 (1986)〕、これにより、糖脂質の糖鎖の調製が容易になっただけでなく、糖脂質、特に細胞表面糖脂質の機能を解明する研究が進展した。また、糖転移酵素により、新たな糖鎖を付加することも可能となってきた。例えば、シアリルトランスフェラーゼにより、糖鎖の末端にシアリ酸を新たに付加することができる〔サベサン(Sabesan)とポールソン(Paulso 40

n): ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー(J. Am. Chem. Soc.), 108, 2068 (1986)〕。その他種々の糖転移酵素やグリコシダーゼの阻害剤〔アランら: アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー(Annu. Rev. Biochem.), 56, 497 (1987)〕を用いることにより、付加する糖鎖を変化させることも可能である。しかしながら、糖鎖の合成に用いる糖転移酵素を大量に製造することは極めて困難である。そこで、組換えDNA技術を用いて糖転移酵素をクローン化し、糖転移酵素を宿主細胞内または培養上清中に効率よく発現させることにより、糖転移酵素を大量に製造することが望まれる。

【0013】これまでに用いられた糖転移酵素遺伝子のクローニング法としては、タンパク質を精製後、それに対する抗体を作成し、それを用いてイムノスクリーニングを行なう方法〔ワインスタイン(Wienstein)ら: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 262, 17735 (1987)〕、タンパク質を精製後、アミノ酸配列を決定し、それに対応する合成DNAを作製し、それをプローブにハイブリダイゼーションを行う方法〔成松ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), USA, 83, 4720 (1986)〕が知られている。クローン化した糖転移酵素の遺伝子をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより、その糖転移酵素にホモロジーのある糖転移酵素の遺伝子をクローン化する方法も知られている〔ロウ(John. B. Lowe)ら: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 266, 17467 (1991)〕。糖鎖に対する抗体やレクチンを用いたパンニング(panning)法をスクリーニング法として用いる直接発現クローン化法が知られている〔ロウ(John. B. Lowe)ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), USA, 86, 8227 (1989)、ロウ(John. B. Lowe)ら: ジーンズ・アンド・ディベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)〕。

【0014】レクチン耐性を指標にして糖転移酵素をクローン化できた例はない。CHO細胞の各種レクチン耐性変異株に関する研究から、それらのレクチン耐性変異株においては、新たな糖転移酵素が発現する場合、ある糖転移酵素の活性が消失する場合、糖ヌクレオチドの合成やゴルジ体への移行に障害がある場合があることが明らかになっている〔スタンレー(Pamela Stanley)ら: メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 96巻, 157頁〕。したがって、CHO細胞またはCHO細胞のレクチン耐性変異株に、クローン化しようとする糖転移酵素を発現している細胞由来の遺伝子を導入し、レクチン耐性を指標に糖転移酵素のクローン化が可能であると考えられる〔クマー(Ravindra Kumar)ら: モレキュラー・アンド・セリュラー・バイオロジー(Mol. C 50

ell.Biol.), 9, 5713(1989)]。リプカ(James Ripka)らは、CHO細胞のレクチン耐性変異株(Lec1)に、A431細胞由来のヒトのジェノミックDNAを導入し、コンカナバリンAというレクチンに対する耐性化を指標にN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIのクローン化を試みている。しかしながら、彼らは、このレクチン耐性を指標にしたスクリーニング法では糖転移酵素をクローン化することはできなかった〔リプカ(James Ripka)ら: バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem.Biophys.Res Commun.), 159, 554(1989)]。ヘファーナンらは、ポリオーマのラージT抗原を生産するようにしたCHO細胞〔ヘファーナン(Michael Heffernan)ら: ヌクレック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Res.), 19, 85(1991)〕に、cDNAライブラリーを導入後、WGA(wheat germ agglutinin)というレクチンに対する耐性化を指標にマウスの sialic acid hydroxylase のクローン化を行なっている〔ヘファーナン(Michael Heffernan)ら: グライココンジュゲート・ジャーナル(Glycoconjugate J.), 8, 154(1991)] が、このレクチン耐性を指標にしたスクリーニング系で糖転移酵素のクローン化ができたという報告はない。また、宿主に関しては、スタンレー、リプカ、ヘファーナンらはいずれもCHO細胞またはCHO細胞のレクチン耐性変異株を宿主として用いている。

【0015】ガラクトシルトランスフェラーゼに関しては、N-アセチルグルコサミニド β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ(N-acetylglucosaminide β 1,4-galactosyltransferase; EC 2.4.1.38)の遺伝子〔シェイパー(Shaper)ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.), USA, 83, 1573(1986)、成松(Narimatsu)ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.), USA, 83, 4720(1986)、マスリ(Masri)ら: バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem.Biophys.Res.Comm.), 157, 657(1988)、シェイパー(Shaper)ら: ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.), 263, 10420(1988)]、血液型B抗原の合成に関与する α 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ(α 1,3-galactosyltransferase; EC 2.4.1.37)の遺伝子〔山本(Yamamoto)ら: ネイチャー(Nature), 345, 229(1990)〕、およびII型ラクト系糖鎖の非還元末端に α 1,3結合でガラクトースを転移する α 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ(α 1,3-galactosyltransferase; EC 2.4.1.151)の遺伝子〔ラーセン(Larsen)ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.), USA, 86, 8227(1989)〕が単離されており、その塩基配列も明らかになっている。 β 1,3-ガラクトシルトランスフ

ェラーゼ活性を有する酵素に関しては、その酵素の性質や精製およびその遺伝子のクローン化については全く報告がない。したがって β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する酵素を大量に調製する手段はなく、該酵素の発現を検出および抑制する方法も確立されていない。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、タンパク質の糖鎖の改変および特定の糖鎖の効率的生産を行うことができる新規 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼおよび該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAおよび該DNAを含有するベクターを提供することにある。さらに、癌転移や炎症などの疾病を診断、治療するために有用な該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの活性発現を検出する方法および該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を抑制する方法を提供することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、動物細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを発現クローニングベクターに組み込むことによりcDNAライブラリーを構築し、該cDNAライブラリーを細胞に導入し、得られる細胞をその細胞の増殖を抑制する活性を有するレクチンの存在下で培養し、増殖する細胞を単離することによりクローン化された遺伝子を宿主細胞に導入して発現させたところ、新規な β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼが生産されることを見出し、本発明を完成させた。

【0018】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する新規 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼおよび該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAおよび該DNAを含有する組換え体ベクターに関する。本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、N-アセチルガラクトサミニド β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有する糖転移酵素であり、受容体である糖鎖の非還元末端のN-アセチルガラクトサミンに β 1 \rightarrow 3の結合様式でウリジン二リン酸(UDP)-ガラクトースからガラクトースを転移する活性を有する。

【0019】本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAとしては、(a)配列番号1で示される記載の塩基配列を有するDNA、(b)一つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、あるいはヒトを含む動物個々に起こる自然変異などのため配列番号1で示される塩基配列とは異なる塩基配列を有するDNA、(c)(a)および(b)で定義されるDNAに対して、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を失わない範囲内で置換変異、欠失変異、挿入変異などの変異が導入されたDNA、例えば、(a)または(b)で定義されるDNAがコードする β 1,3-ガラクトシ

ルトランスフェラーゼに対して、ハイブリダイゼーション法によって単離できる程度に相同性を有するDNAなどを包含する。本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは上記(a)、(b)および(c)で定義されるDNAによってコードされる全ての β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを包含する。

【0020】以下に、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAの製造法を上記(a)で定義されるcDNAの製造法を例にして示す。動物細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを発現クローニングベクター(Expression Cloning Vector)に組み込むことにより、cDNAライブラリーを構築する。このcDNAライブラリーを動物細胞あるいは昆虫細胞に導入し、その細胞の増殖を抑制する活性を有するレクチンの存在下で細胞を培養する。cDNAが導入された細胞クローンのなかに、糖転移酵素をコードする遺伝子が発現したために、レクチンが認識する糖鎖構造が変化し、レクチンに対する感受性を失い、レクチン存在下で増殖する細胞クローンが現れる。この細胞を単離し、該細胞から所望の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを得る。

【0021】上記の方法で用いられる動物細胞は、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを生産している動物細胞であればいかなる細胞でも用いることができる。例えば、ヒト・メラノーマ細胞株WM266-4(ATCC CRL 1676)等が用いられる。これらの細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込み発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAMoPRC3Sc等が用いられる。該ベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する動物細胞あるいは昆虫細胞は、該cDNAライブラリーを導入し、発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ヒト・ナマルバ(Namalwa)細胞〔細井ら：サイトテクノロジー(Cytotechnology), 1, 151(1988)〕等が用いられる。また、本発明で用いられるレクチンは、宿主細胞の増殖を抑制できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ヒマメレクチン120等が用いられる。レクチンは使用する宿主細胞の該レクチンに対する耐性を決定した後に、宿主細胞の成育を阻止する濃度で使用する。レクチン存在下で増殖する細胞から公知の方法、例えば、ハート法〔ロバート・エフ・マーゴルスキー(Robert F. Margolskee)ら：モレキュラー・アンド・セリュラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 8, 2837(1988)〕により、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを有するプラスミドあるいは該cDNA部分を含むDNA断片を回収する。本発明の酵素をコードするcDNAを有するプラスミドとしては、例えば、pUC119-WM1が挙げられる。pUC119-WM1を含む大腸菌であるEscheric

hiacoli HB101/pUC119-WM1は、平成4年9月22日付で工業技術院微生物工業技術研究所にFERM BP-4011として寄託されている。

【0022】上記(b)および(c)で定義されるDNAは上記の製造法で得られる β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAをもとに、ハイブリダイゼーション法やDNAに変異を導入する方法などの周知の組換えDNA技術を用いて製造することができる。また、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAは化学合成法を用いても製造することができる。

【0023】上記の方法により得られる本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAを適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入し、得られた細胞を培養することにより、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを製造することができる。ここで、用いられる宿主細胞としては、原核細胞、動物細胞、酵母、カビ、昆虫細胞など、これまで組換えDNA技術で用いられた宿主細胞ならばいかなる細胞でも用いることができる。例えば、原核細胞としては大腸菌、動物細胞としてはチャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、サルの細胞であるCOS細胞、ヒトの細胞であるナマルバ細胞等が挙げられる。宿主としてナマルバ細胞を用いる直接発現クローン化系は、宿主であるナマルバ細胞へのcDNAライブラリーの導入効率が極めて高く、しかも導入されたプラスミド(cDNAライブラリー)は、染色体外で存在可能であり、取得したレクチン耐性株からのプラスミドの回収が容易であるという利点を有しているため好適に用いられる。

【0024】本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAを導入するベクターとしては、該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。例えば、pAGE107〔特開平3-22979, Miyajiriら：サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)〕, pAS3-3〔特開平2-227075〕, pAMoERC3Sc, CDM8〔ブライアン・シード(Brian Seed)ら：ネイチャー(Nature), 329, 840(1987)〕等が挙げられる。また、大腸菌内で本発明の酵素を生産するためには、trpプロモーターなどの強力な転写活性を有するプロモーターの下流に外来DNAを挿入することができ、しかもシャイン・ダルガノ(Shine-Dalgarno)配列(以下、SD配列と略記する)と開始コドンの間を適当な距離(例えば、6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。具体的には、pKYP10〔特開昭58-110600〕, pLSA1〔宮地ら：アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 53, 277(1989)〕, pGEL1〔関根ら：プ

ロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.),USA, 82,430 6(1985)] 等が挙げられる。

【0025】本発明で用いる組換えDNA技術の一般的手法については、特開平2-227075あるいはサンプブック (Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)らの方法〔モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊〕に記載されている方法を用いることができる。mRNAの単離およびcDNAライブラリーの合成は、上記の方法の他、市販されている多くのキットを用いて行なうことができる。動物細胞へのDNAの導入法としては、現在までに知られているいかなる方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法〔Miyajiら：サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3,133(1990)〕、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔フィリップ・エル・フェルグナー (Philip L. Felgner)ら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.),USA,84,7413 (1987)] 等を用いることができる。形質転換株の取得および培養は、特開平2-227075あるいは特開平2-257891に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0026】クローン化した β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法がある。生産部位は、使用する宿主細胞の種類、生産させる糖転移酵素の形によって変わってくる。糖転移酵素をその形を変えずに動物細胞を宿主細胞として生産させる場合は、一般的に、宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産され、一部は、プロテアーゼにより切断されて細胞外に分泌される。宿主細胞外に積極的に分泌させる場合は、ポールソンらの方法〔C. Paulsonら：ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J.Biol.Chem.), 264,17619 (1989)〕およびロウらの方法〔John. B. Loweら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.),USA,86,8227 (1989)、John. B. Loweら：ジーンズ・アンド・ディベラプメント (Genes Develop.),4,1288 (1990)] に準じて遺伝子組換えの手法を用いて、糖転移酵素の活性部位を含む部分にシグナルペプチドを付加した形で生産させる。

【0027】特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。このようにして生産させた本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼは、通常の糖転移酵素の精製方法〔J. E van. Sadlerら：メソッド・イン・エンザイモロジー

(Methods in Enzymology), 83,458] に準じて精製できる。また、大腸菌内に生産させる場合は、上記の方法と特開昭63-267292に記載された方法を組み合わせることにより効率的に精製することができる。また、本発明の酵素を他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法〔John. B. Loweら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.),USA,86,8227(1989)、John. B. Loweら：ジーンズ・アンド・ディベラプメント (Genes Develop.),4,1288 (1990)] に準じて、本発明の酵素をプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、該酵素自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0028】 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの活性は、公知の測定法〔Naoyuki Tanigutiら：メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 179,397] に準じて測定する。本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いて、イン・ビトロ(invito)で、糖鎖を合成することができる。例えば、糖タンパク質、糖脂質またはオリゴ糖に含まれるN-アセチルガラクトサミンに β 1 \rightarrow 3結合でガラクトースを付与することができる。また、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを α 2,3-シアリルトランスフェラーゼと α 1,3/1,4-フコシルトランスフェラーゼ〔ロウ (Lowe)ら：ジーンズ・アンド・ディベラプメント (Genes Develop.),4,1288 (1990)] の存在下、基質となる糖タンパク質、糖脂質またはオリゴ糖に作用させることにより、糖鎖上にルイスaまたはシアリル・ルイスa構造を導入することができる。

【0029】本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAを用いて、該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの受容基質である糖鎖を生産している動物細胞あるいは昆虫細胞の中で、該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼと有用生理活性を有する糖タンパク質、糖脂質またはオリゴ糖とを同時に生産させることにより、生産された β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを細胞の中で糖タンパク質、糖脂質またはオリゴ糖に作用させ、糖鎖構造が変化した糖タンパク質、糖脂質またはオリゴ糖を細胞の中で得ることができる。

【0030】さらに、上記の方法により得られる糖鎖構造が変化した糖タンパク質、糖脂質またはオリゴ糖から公知の酵素的手法または化学的手法によりオリゴ糖の一部を切り出すこともできる。本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAは、タンパク質や糖脂質の糖鎖の改変および特定の糖鎖の効率的生産に用いることができるだけでなく、アンチセンスRNA

／DNA技術を用いて炎症や癌転移などの疾病の治療に利用すること、ならびにノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法を用いてそれらの疾病の診断に利用することもできる。

【0031】例えば、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAを用いて、アンチセンスRNA／DNA技術〔徳久(Tokuhisa)：バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 - 326 (1992)、村上(Murakami)：化学, 46, 681 - 684 (1991)、ミラー(Miller)：バイオテクノロジー(Biotechnology), 9, 358 - 362 (1992)、コーエン(Cohen)：トレンドズ・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 10, 87 - 91 (1992)、アグラワル(Agrawal)：トレンドズ・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 10, 152 - 158 (1992)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔チュブ(Chubb)とホーガン(Hogan)：トレンドズ・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 10, 132 - 136 (1992)〕により、該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの活性発現を抑制することができる。具体的には、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAの一部の塩基配列、好ましくは翻訳開始領域内の10～50塩基の塩基配列を基にしてオリゴヌクレオチドを設計・調製し、生体内に投与するにより、該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの生産を抑制することができる。合成オリゴヌクレオチドの塩基配列としては、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするcDNAのアンチセンス鎖の塩基配列の一部と一致するもの、あるいは該 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの活性発現を抑制する活性を失わない範囲内で改変したものを利用できる。トリプル・ヘリックス技術を用いる場合、センス鎖およびアンチセンス鎖の双方の塩基配列の塩基配列情報をもとに合成オリゴヌクレオチドの塩基配列を設計する。

【0032】また、ハイブリダイゼーション法またはPCR法により本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を検出することができる。ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法を用いて、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を検出するために、本発明の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードするDNAまたはそれらの塩基配列に基づいてDNAプローブまたは合成オリゴヌクレオチドを調製する。ノーザンハイブリダイゼーション法およびPCR法は、それぞれ公知の方法〔モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊行；PCRプロトコールズ(PCR Protocols)、アカデミック・プレス(Academic Press)、1990年刊行)に従って行う。

【0033】以下、本発明の実施例を示す。

【0034】

【実施例】

実施例1

1. 直接発現クローニングベクター(Expression Cloning Vector) pAMoERC3ScおよびpAMoPRC3Scの造成：pAMoERC3Scを以下に示す

(1)～(14)の工程に従って造成した。

(1) pAGEL106の造成 (図1参照)

シミアン・ウィルス(simian virus)40(SV40)初期遺伝子プロモーターとヒトT細胞白血病ウイルス(human T-cell leukemia virus type-1: HTLV-1)のロング・ターミナル・リピート(long terminal repeat: LTR)のR領域とU5領域の一部を融合したプロモーターを有するプラスミドpAGEL106の造成を以下のようにして行なった。R領域とU5領域の一部を含むDNA断片[BanII-Sau3A断片(0.27kb)]はpATK03から切り出し、合成リンカーを介してpAGE106のBglI-BamHI間に挿入した。

【0035】pAGE106(特開平2-227075)の1 μ gを10mMトリス-塩酸(pH7.5)、6mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウム、6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液(以下、Y-100緩衝液と略記する)30 μ lに溶解し、10単位のBglI(宝酒造社製、以下、とくに断らないかぎり制限酵素は宝酒造社製のものを使用した)と10単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約4.9kbのDNA断片を回収した。

【0036】また、pATK03〔清水ら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), USA, 69, 2110(1972)〕1 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶解し、10単位のBanIIを加え、37°Cで2時間消化反応を行ない、アガロースゲル電気泳動後、約0.4kbのDNA断片を回収した。回収したDNA断片は30 μ lのY-100緩衝液に溶解し、10単位のSau3AIを加え37°Cで2時間消化反応を行ない、アガロースゲル電気泳動後、約0.27kbのDNA断片を回収した。

【0037】また別に、BglI切断部位とBanII切断部位を連結するためのリンカーとして以下のDNAリンカーを合成した。

【0038】

【化1】

5'-CGGGCT-3' (6 mer)

3'-GGAGC-5' (5 mer)

【0039】このDNAリンカーの5merと6merの1本鎖DNAはそれぞれアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社380A・DNA合成機を用いて合成した。合成したDNAはそれぞれ0.2 μ gずつ、50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、5mMジチオスレイトール(以下DTTと略記する)、0.1mMEDTA,

および1mM アデノシン3リン酸（以下、ATP と略記する）を含む緩衝液（以下、T4キナーゼ緩衝液と略記する）40 μ l に溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製、以下同じ）30単位を加えて、37°Cで2時間リン酸化反応を行なった。

【0040】上記で得られたpAGEL106由来のBglI-BamHI 断片(4.9kb) 0.2 μ g とpATK03由来のBamHI-Sau3A 断片(0.27kb) 0.01 μ g を 66mM トリス-塩酸(pH7.5), 6.6mM 塩化マグネシウム, 10mM DTTおよび0.1mM ATP からなる緩衝液（以下、T4リガーゼ緩衝液と略記する）30 μ l に溶解し、上記DNAリンカーを0.01 μ g とT4DNA リガーゼ（宝酒造社製、以下同じ）175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。

【0041】該反応液を用いて大腸菌HB101 株〔ポリバ- (Bolivar) ら：ジーン(Gene), 2, 75, (1988)] をコーエンらの方法〔エス・エヌ・コーエン(S.N.Cohen) ら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.)USA, 69, 2110 (1972)] （以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた）によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法〔エイチ・シー・バーンボイム (H.C.Birnboim) ら：ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 7, 1513(1979)] （以下、プラスミドの単離はこの方法を用いた）に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAGEL106と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0042】(2) pASLB3-3-1の造成（図2参照）

SV40初期遺伝子プロモーターとHTLV-1のロング・ターミナル・リピート(LTR)のR 領域とU5領域の一部を融合したプロモーターを有する、ヒト顆粒球コロニー刺激因子(hG-CSF)の発現プラスミドpASLB3-3-1の造成を以下のようにして行なった。

【0043】(1) で得られたpAGEL106の 0.5 μ g を10mM トリス-塩酸(pH7.5), 6mM 塩化マグネシウム, 20mM 塩化カリウム, 6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液（以下、K-20緩衝液と略記する）30 μ l に溶解し、10単位のSmaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30 μ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、SalIリンカー（5'-pGGTCGACC-3' : 宝酒造社製）を0.01 μ g とT4DNA リガーゼ175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。エタノール沈殿後、10mM トリス-塩酸(pH7.5), 6mM 塩化マグネシウム, 175mM 塩化ナトリウム, 6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液（以下、Y-175緩衝液と略記する）30 μ l に溶解し、10単位のSalIと10単位のMluIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約1.7kb のDNA 断片を回収した。

【0044】一方、pAS3-3（特開平2-227075）の1 μ g をY-175緩衝液 30 μ l に溶解し、10単位のSalIと10単位のMluIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約6.7kb のDNA 断片を回収した。上記で得られたpAGEL106由来のMluI-SalI 断片(1.7kb) 0.1 μ g とpAS3-3由来のMluI-SalI 断片(6.7kb) 0.2 μ g をT4リガーゼ緩衝液 30 μ l に溶解し、T4DNAリガーゼ175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101 株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpASLB3-3-1と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0045】(3) pASLB3-3の造成（図3参照）

pASLB3-3-1にアンピシリン耐性遺伝子を導入したプラスミドpASLB3-3の造成を行なうため、以下のようにしてpAS3-3のアンピシリン耐性遺伝子を含むDNA 断片〔XhoI-MluI 断片(7.26kb)] をpASLB3-3-1のXhoI-MluI 間に導入した。

【0046】(2) で得られたpASLB3-3-1の1 μ g を10mM トリス-塩酸(pH7.5), 6mM 塩化マグネシウム, 150mM 塩化ナトリウム, 6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液（以下、Y-150緩衝液と略記する）30 μ l に溶解し、10単位のXhoIと10単位のMluIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約7.26kbのDNA 断片を回収した。

【0047】一方、pAS3-3の1 μ g をY-150緩衝液 30 μ l に溶解し、10単位のXhoIと10単位のMluIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約2.58kbのDNA 断片を回収した。上記で得られたpASLB3-3-1由来のXhoI-MluI 断片(7.26kb) 0.2 μ g とpAS3-3由来のXhoI-MluI 断片(2.58kb) 0.1 μ g とをT4リガーゼ緩衝液30 μ l に溶解し、T4DNAリガーゼ175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101 株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpASLB3-3と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0048】(4) pASLBE3-3の造成（図4参照）

pASLB3-3中のジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)発現ユニットを除去し、エプシュタイン・バーン・ウイルス (Epstein-Barr virus) の複製開始点(oriP)とEBNA-1遺伝子(oriPにトランスに作用し、複製を引き起こす働きを有する遺伝子)を導入したプラスミドpASLBE3-3の造成を

以下のようにして行なった。oriPとEBNA-1遺伝子は、p201〔ビル・ズグデン(Bill Sugden)ら、ネイチャー (Nature) 313, 812 (1985)〕のNar I部位にpUC12〔メッシング(Messing)ら：メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 101, 20 (1983)〕由来のマルチクローニングサイトを含む SmaI-HaeIII断片が組み込まれたプラスミドであるp220.2から切り出して使用した。

【0049】p220.2の1 μ g をY-100緩衝液30 μ l に溶解し、20単位のEcoRIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30 μ l のDNAポリメラーゼI緩衝液〔50mM トリス-塩酸(pH7.5), 10 mM 塩化マグネシウム, 0.1mM dATP (デオキシアデノシン3リン酸), 0.1mM dCTP (デオキシシチジン3リン酸), 0.1mM dGTP (デオキシグアノシン3リン酸), 0.1mM TTP (チミジン3リン酸)〕に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラーゼIクレノー断片を加え、37°Cで60分間反応させ、EcoRI 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、20 μ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、XhoIリンカー (5'-pCCTCGAGG-3' : 宝酒造社製)を0.05 μ g とT4DNAリガーゼ175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。エタノール沈殿後、Y-100緩衝液30 μ l に溶解し、10単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30 μ l のDNAポリメラーゼI緩衝液に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片を加え、37°Cで60分間反応させ、BamHI 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、Y-100緩衝液30 μ l に溶解し、10単位のXhoIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約4.9kbのDNA断片を回収した。

【0050】また、(3)で得られたpASLB3-3 (1 μ g)をY-100緩衝液30 μ l に溶解し、20単位XhoIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿の後、30 μ l のDNAポリメラーゼI緩衝液に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片を加え、37°Cで60分間反応させ、XhoI消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、10mM トリス-塩酸(pH7.5), 6mM 塩化マグネシウム, 6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液(以下、Y-0緩衝液と略記する)30 μ l に溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反*

*応液をアガロースゲル電気泳動後、約1.3kbのDNA断片を回収した。

【0051】また、pAGE107〔特開平3-22979、Miyajiら：サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)〕1 μ g をY-0緩衝液30 μ l に溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が100 mMになるように塩化ナトリウムを添加し、20単位のXhoIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約6.0kbのDNA断片を回収した。

【0052】上記で得られたp220・2由来のXhoI-BamHI (平滑末端)断片(4.9kb)0.2 μ g とpASLB3-3由来のXhoI (平滑末端)-KpnI断片(1.3kb)0.1 μ g とpAGE107由来のKpnI-XhoI断片(6.0kb)0.2 μ g とをT4リガーゼ緩衝液30 μ l に溶解し、T4DNAリガーゼ175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpASLB3-3と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

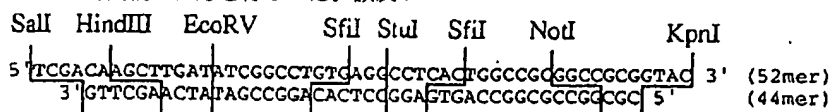
【0053】(5)pASLB3Cの造成 (図5参照)pASLB3-3中のhG-CSF遺伝子を除去し、そのかわりにマルチクローニングサイトを導入したプラスミドpASLB3Cを以下のように造成した。マルチクローニングサイトは、合成DNAを用いて作成した。

【0054】(3)で得られたpASLB3-3の1 μ g をY-175緩衝液30 μ l に溶解し、20単位のSalIと20単位のMluIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約3.1kbのDNA断片を回収した。また、同プラスミド1 μ g をY-0緩衝液30 μ l に溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が150 mMになるように塩化ナトリウムを添加し、20単位のMluIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約6.0kbのDNA断片を回収した。

【0055】また別に、SalI切断部位とKpnI切断部位を連結するためのリンカーとして以下のDNAリンカーを合成した。なお、このリンカー中にはHindIII, EcoRV, SfiI, StuI, NotIの各制限酵素切断部位が組み込まれている。

【0056】

【化2】



【0057】このDNAリンカーの52mer（配列番号3）と44mer（配列番号4）の1本鎖DNAはそれぞれアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。合成したDNAはそれぞれ0.2 μ gずつ、T4キナーゼ緩衝液20 μ lに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造社製、以下同じ）30単位を加えて、37°Cで2時間リン酸化反応を行なった。

【0058】上記で得られたpASLB3-3由来のSalI-MluI断片(3.1kb) 0.1 μ gと同プラスミド由来のKpnI-MluI断片(6.0kb) 0.2 μ gとをT4リガーゼ緩衝液30 μ lに溶解し、上記DNAリンカー0.01 μ gとT4 DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpASLBCと名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0059】(6) pASLBECの造成（図6参照）

pASLBC中のジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)発現ユニットを除去し、oriPとEBNA-1遺伝子を導入したプラスミドpASLBECを以下のようにして造成した。

【0060】(4)で得られたpASLB3-3の1 μ gをY-150緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のMluIと20単位のXhoIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約1.3kbのDNA断片を回収した。また、同プラスミド1 μ gをY-0緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が150 mMになるように塩化ナトリウムを添加し、5単位のMluIを加え、さらに37°Cで20分間部分消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約9.6kbのDNA断片を回収した。

【0061】また別に、(5)で得られたpASLBCの1 μ gをY-0緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が100 mMになるように塩化ナトリウムを添加し、20単位のXhoIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約0.6kbのDNA断片を回収した。

【0062】上記で得られたpASLB3-3由来のMluI-XhoI断片(1.3kb) 0.2 μ gと同プラスミド由来のKpnI-MluI断片(9.6kb) 0.2 μ gとpASLBC由来のKpnI-XhoI断片(0.6kb) 0.05 μ gとをT4リガーゼ緩衝液30 μ lに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpASLBECと名付け、その構造を制限酵素消

化により確認した。

【0063】(7) pASLBEC2の造成（図7参照）

pASLBECのマルチクローニングサイト中のStuIサイトにBamHIリンカーを導入したプラスミドpASLBEC2を以下のようにして造成した。pASLBEC2では、マルチクローニングサイト中のStuIサイトは消失している。

【0064】(6)で得られたpASLBECの1 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶解し、5単位のStuIを加え、37°Cで20分間部分消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約11.5kbのDNA断片を回収した。回収したDNA断片を30 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、BamHIリンカー（5'-pCCGGATCCGG-3'：宝酒造社製）を0.01 μ gとT4DNAリガーゼ175単位とを加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。エタノール沈殿後、Y-100緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約11.5kbのDNA断片を回収した。回収したDNA断片を20 μ lのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpASLBEC2と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0065】(8) pAMoEC2の造成（図8参照）

pASLBEC2中のプロモーター[SV40初期遺伝子プロモーターとHTLV-1のロング・ターミナル・リピート(long terminal repeat : LTR)のR領域とU5領域の一部を融合したプロモーター]をモロニー・マウス白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート(long terminal repeat : LTR)のプロモーターにすげかえたプラスミドpAMoEC2の造成を以下のようにして行なった。なお、モロニー・マウス白血病ウイルスLTRのプロモーターは、プラスミドMolp-1[アキノリ・イシモト(Akinori Ishimoto)ら、ヒロロジー(Virology), 141, 30 (1985)]から切り出して使用した。

【0066】(7)で得られたpASLBEC2の1 μ gを10mMトリス-塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウム, 50mM塩化カリウム, 6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液（以下、K-50緩衝液と略記する）30 μ lに溶解し、20単位のHindIIIと20単位のAatII（東洋紡績社製）を加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約4.8kbのDNA断片を回収した。

【0067】また、同プラスミド1 μ gをK-50緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のAatIIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、5単位のXhoIを加

え、さらに37°Cで20分間部分消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約6.1kbのDNA断片を回収した。次に、XhoI切断部位とClaI切断部位を連結するため、以下のDNAリンカーを合成した。

【0068】

【化3】

5'-TCGAGGACC-3' (9 mer)

3'-CCTGGGC-5' (7 mer)

【0069】上記DNAリンカーの9merと7merの1本鎖DNAはそれぞれアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。合成したDNAはそれぞれ0.2 μgずつ、T4キナーゼ緩衝液40 μlに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加えて、37°Cで2時間リン酸化反応を行なった。また別に、Mol p-1 [アキノリ・イシモト (Akinori Ishimoto) ら、ピロロジー (Virology), 141, 30 (1985)] 1 μg をY-50緩衝液30 μlに溶解し、20単位のClaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30 μlのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、上記DNAリンカー-0.01 μgとT4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。エタノール沈殿後、K-20緩衝液30 μlに溶解し、20単位のSmaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約0.6kbのDNA断片を回収した。回収したDNA断片を30 μlのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、HindIIIリンカー (5'-pCAAGCTTG-3' : 宝酒造社製) を0.03 μgとT4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。エタノール沈殿後、10mMトリス-塩酸 (pH7.5), 6mM塩化マグネシウム, 50mM塩化ナトリウム, 6mM2-メルカプトエタノールからなる緩衝液 (以下、Y-50緩衝液と略記する) 30 μlに溶解し、10単位のHindIIIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が100 mMになるように塩化ナトリウムを添加し、10単位のXhoIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約0.6kbのDNA断片を回収した。

【0070】上記で得られたpASLBEC2由来のHindIII-AatII断片(4.8kb) 0.2 μgと同プラスミド由来のAatII-XhoI断片(6.1kb) 0.2 μgとMol p-1由来のHindIII-XhoI断片(0.6kb) 0.05 μgとをT4リガーゼ緩衝液30 μlに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoEC2と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0071】(9) pAMoEC3の造成 (図9参

照)

pAMoEC2のマルチクローニングサイト中のBamHIサイトに、詰め込みDNA (Stuffer DNA)として、pBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片 [DraI-PvuII断片(2.5kb)] を以下のようにして挿入し、プラスミドpAMoEC3を造成した。

【0072】(8)で得られたpAMoEC2の1 μgをY-100緩衝液30 μlに溶解し、20単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30 μlのDNAポリメラーゼI緩衝液に溶解し、6単位のDNAポリメラーゼI・クレノー断片を加え、37°Cで60分間反応させ、BamHI消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約11.5kbのDNA断片を回収した。

【0073】また、pBR322 [ポリバー (Bolivar) ら : ジーン (Gene), 2, 95 (1977)] 1 μgをY-50緩衝液30 μlに溶解し、20単位のDraIと20単位のPvuIIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約2.5kbのDNA断片を回収した。上記で得られたpAMoEC2由来のBamHI (平滑末端)断片(11.5kb) 0.1 μgとpBR322由来のDraI-PvuII断片(2.5kb) 0.2 μgとをT4リガーゼ緩衝液30 μlに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリンとテトラサイクリンに耐性である株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoEC3と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0074】(10) pAMoERC3の造成 (図10参照)

pAMoEC3中のoriPとEBNA-1遺伝子のユニットの向きを逆にしたプラスミドpAMoERC3を以下のようにして造成した。

【0075】(9)で得られたpAMoEC3の1 μgをY-100緩衝液30 μlに溶解し、20単位のXhoIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、1Mトリス-塩酸(pH8.0)を30 μlと大腸菌アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) 1単位を加え、37°Cで2時間脱リン酸化反応を行なった。エタノール沈殿後、10mMトリス-塩酸(pH8.0), 1mM EDTA (エチレンジアミン4酢酸ナトリウム) からなる緩衝液 (以下、TE緩衝液と略記する) 30 μlに溶解し、アガロースゲル電気泳動後、約9.1kbのDNA断片を回収した。

【0076】また、同プラスミド1 μgをY-100緩衝液30 μlに溶解し、20単位のXhoIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約4.9kbのDNA断片を回収した。上記で得られたpAMoEC3由来のXhoI断片(9.1kb) 0.1 μgと同プラスミド由来のXhoI断片(4.9kb) 0.2 μgをT4リ

ガーゼ緩衝液30 μ l に溶解し、T4DNA リガーゼ175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101 株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoERC3と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0077】(11) pAGE207の造成 (図11参照)

pAGE107 中のG418耐性遺伝子をハイグロマイシン(hyg) 10
耐性遺伝子にすげかえたプラスミドpAGE207 を以下のよ
うにして造成した。なお、hyg 耐性遺伝子は、p201〔ビル・ズグデン(Bill Sugden)ら、ネイチャー (Nature)
 , 313, 812 (1985)〕より切り出して使用
した。

【0078】PAGE107（特開平3-22979）の1 μ gをY-50緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のClaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が150 mMになるように塩化ナトリウムを添加し、20単位のMluIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約4.6kbのDNA断片を回収した。

【0079】p201 [ビル・スグデン (Bill Sugden) ら：ネイチャー (Nature), 313, 812 (1985)] 0.5 μ g を Y-50 緩衝液 30 μ l に溶解し、20 単位の NarI [ニュー・イングランド・バイオラボ (New England Biolab) 社製] を加え、37°C で 2 時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30 μ l の DNA ポリメラーゼ I 緩衝液に溶解し、6 単位の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I・クレノー断片を加え、37°C で 60 分間反応させ、NarI 消化によって生じた 5' 突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿後、20 μ l の T4 リガーゼ緩衝液に溶解し、ClaI リンカー (5'-p C A T C G A T G-3' : 宝酒造社製) を 0.05 μ g と T4 DNA リガーゼ 175 単位を加えて、12°C で 16 時間結合反応を行なった。エタノール沈殿後、Y-50 緩衝液 30 μ l に溶解し、10 単位の ClaI を加え、37°C で 2 時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が 150 mM になるように塩化ナトリウムを添加し、10 単位の MluI を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約 1.6 kb の DNA 断片を回収した。

【0080】上記で得られたpAGE107由来のClaI-MluI断片(4.6kb) 0.2 μ g とp201由来のClaI-MluI断片(1.6kb) 0.1 μ g とをT4リガーゼ緩衝液30 μ lに溶解し、T4DNA リガーゼ175 単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101 株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpA 50

GE207と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0081】(12) pAGE207ScNの造成
(図12参照)

ラビットβグロビン遺伝子中に存在するSfiIサイトの類似配列を除去するため、pAGE207のBamIサイトにScaIリンカーを挿入したプラスミドpAGE207ScNを以下のようにして造成した。なお、pAGE207ScNにおいては、挿入されたScaIリンカーの数は明らかではない。

10 【0082】(11) で得られた pAGE207 の 0.5
μg を Y-0 緩衝液 30 μl に溶解し、10 単位の BclI を加
え、37°C で 2 時間消化反応を行なった。エタノール沈殿
後、20 μl の T4 リガーゼ緩衝液に溶解し、ScaI リンカ
ー (5'-pAAGTACTT-3' : 宝酒造社製) を 0.01 μ
g と T4DNA リガーゼ 175 単位を加えて、12°C で 16 時間結
合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌 HB101 株を
コーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐
性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプ
ラスミドを単離した。このプラスミドを pAGE207
20 ScN と名付け、その構造を制限酵素消化により確認し
た。

【0083】(13) pAMoC3Scの造成 (図13参照)

pAmoERC3中のラビット β グロビン遺伝子中に存在するSfiIサイトの類似配列を除去するため、以下のようにしてpAmoERC3中のラビット β グロビン遺伝子を、すでにその類似配列を除去してあるpAGE207ScN中のラビット β グロビン遺伝子にすげかえ、プラスミドpAmoERC3Scを造成した。造成の都合上、まずpAmoC3Scを造成し、次いでpAmoERC3Scの造成を行なった。前記のpAGE207ScNにおいては、SfiIサイトの類似配列を除去するために挿入されたScaIリンカーの数は明らかではないが、pAmoERC3Scの場合は、造成の際にpAGE207ScNを一度ScaIで切断しているため、挿入されたScaIサイトの数は1つであると推定される。

【0084】(12)で得られたpAGE207ScNの1 μ gをY-0緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が100 mMになるように塩化ナトリウムを添加し、20単位のScaIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約0.7kbのDNA断片を回収した。

【0085】また、同プラスミド1 μg をY-100緩衝液 30 μl に溶解し、20単位のScaIと20単位のClaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約0.9kbのDNA断片を回収した。また、別に(10)で得られたpAMoERC3の1 μg をY-0緩衝液30 μl に溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が100mMになるように塩化ナトリウ

ムを添加し、20単位のXhoIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約3.2kbのDNA断片を回収した。

【0086】次に、pAGE107 (特開平2-227075)の1μgをY-100緩衝液30μlに溶解し、20単位のXhoIと20単位のClaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約4.3kbのDNA断片を回収した。上記で得られたpAGE207ScN由来のKpnI-ScaI断片(0.7kb)0.1μgと同プラスミド由来のScaI-ClaI断片(0.9kb)0.1μgとpAMoERC3由来のKpnI-XhoI断片(3.2kb)0.3μgとpAGE107由来のXhoI-ClaI断片(4.3kb)0.3μgとをT4リガーゼ緩衝液30μlに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoC3Scと名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0087】(14)pAMoERC3Scの造成 (図14参照)

(10)で得られたpAMoERC3の1μgをY-0緩衝液30μlに溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が150mMになるように塩化ナトリウムを添加し、20単位のMluIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約6.8kbのDNA断片を回収した。

【0088】また、同プラスミド1μgをY-150緩衝液30μlに溶解し、20単位のXhoIと20単位のMluIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約1.3kbのDNA断片を回収した。また別に、(3)で得られたpAMoC3Scの1μgをY-0緩衝液30μlに溶解し、20単位のKpnIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が100mMになるように塩化ナトリウムを添加し、20単位のXhoIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約5.9kbのDNA断片を回収した。

【0089】上記で得られたpAMoERC3由来のKpnI-MluI断片(6.8kb)0.2μgと同プラスミド由来のXhoI-MluI断片(1.3kb)0.05μgとpAMoC3Sc由来のKpnI-XhoI断片(5.9kb)0.2μgとをT4リガーゼ緩衝液30μlに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoERC3Scと名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0090】pAMoERC3Scは、異種遺伝子発現用のプロモーターとして、モロニー・マウス白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート(long terminal repeat)を有している。また、異種遺伝子の効率良い発現のために、ラビットβグロビン遺伝子スプライシングシグナル、ラビットβグロビン遺伝子ポリA付加シグナルおよびSV40初期遺伝子ポリA付加シグナルが、挿入した異種遺伝子の後ろに付加するように構築されている。また、動物細胞用の薬剤耐性マーカーとしてG418耐性遺伝子を、大腸菌用の薬剤耐性マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子(G418耐性遺伝子と同じもの)とアンピシリン耐性遺伝子をそれぞれ有している。さらに、エプシュタイン・バー・ウイルス(Epstein-Barr virus)の複製開始点(oriP)とoriPにトランスに作用し複製を引き起こす働きをもつEBNA-1遺伝子を有するため、ナマルバ細胞をはじめとして齧歯類を除く多くの細胞中で、染色体に組み込まれることなくプラスミド状態で存在することができる。

【0091】pAMoERC3Scを用いたcDNAライブラリーの造成は、cDNAの両末端にSfiIリンカーを付加した後、pAMoERC3Sc中のSfiI部位に組み込むことにより行なうことができる。

【0092】(15)pAMoPRC3Scの造成 (図15参照)

ナマルバ細胞のようにEBNA-1遺伝子をもともと発現している細胞を宿主として用いる際には、プラスミドpAMoERC3Sc中のEBNA-1遺伝子がなくても、宿主に導入したプラスミドは染色体に組み込まれることなくプラスミド状態で存在できると考えられる。そこで、pAMoERC3ScからEBNA-1遺伝子を除去したプラスミドpAMoPRC3Scの造成を以下のようにして行なった。pAMoPRC3Scは、pAMoERC3Scと同様に、直接発現クロニングベクターとして使用することができる。

【0093】(14)で得られたpAMoERC3Scの2μgをY-50緩衝液30μlに溶解し、20単位のNsiI[ニュー・イングランド・バイオラプス(New England Biolabs)社製]を加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30μlのDNAポリメラーゼI緩衝液に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片を加え、37°Cで60分間反応させ、NsiI消化によって生じた3'突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、Y-100緩衝液30μlに溶解し、20単位のNotIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約8.1kbのDNA断片を回収した。

【0094】また、同プラスミド2μgをY-100緩衝液30μlに溶解し、20単位のXhoIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30μlの

DNAポリメラーゼI緩衝液に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片を加え、37°Cで60分間反応させ、XhoI消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、Y-100緩衝液30μlに溶解し、20単位のNotIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約3.2kbのDNA断片を回収した。

【0095】上記で得られたpAMoERC3Sc由来のNsiI(平滑末端)-NotI断片(8.1kb)0.1μgと同プラスミド由来のXhoI(平滑末端)-NotI断片(3.2kb)0.1μgとをT4リガーゼ緩衝液30μlに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoPRC3Scと名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0096】2. ナマルバ細胞のヒマメレクチン120に対する耐性度の検討

無血清培地馴化ナマルバ細胞(KJM-1株)〔細井ら、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 1, 151(1988)〕を種々の濃度のヒマメレクチン120存在下で培養し、KJM-1株のヒマメレクチン120に対する耐性度を調べた。KJM-1株をRPMI1640・ITPSGF培地〔7.5%炭酸水素ナトリウムを1/40量、200mM L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000ユニット/ml ペニシリン、5000μg/mlストレプトマイシン含有)を0.5%、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸〔N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; HEPES〕(10mM)、インシュリン(3μg/ml)、トランスフェリン(5μg/ml)、ビルビン酸ナトリウム(5mM)、アセレン酸ナトリウム(125nM)、ガラクトース(1mg/ml)、プルロニック(Pluronic)F68(0.1%w/v)を添加したRPMI1640培地(白水製薬社製)で5×10⁴細胞/mlの濃度になるように懸濁し、96穴マイクロタイタープレートに200μlずつ分注した。そこに各種濃度のヒマメレクチン120(生化学工業社製)を1/100量ずつ添加し、CO₂インキュベーターで37°Cで3週間培養した。その結果、KJM-1株の成育を完全に阻止するヒマメレクチン120の最小濃度は50ng/mlであった。400万個のKJM-1株について調べたところ、この濃度において、ヒマメレクチン120耐性株の自然発生的な出現は見られなかった。

【0097】3. ヒト・メラノーマ細胞であるWM266-4細胞からのβ1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子(WM1)のクローン化

(1) ヒト・メラノーマ細胞株であるWM266-4細胞から

のmRNAの取得

1×10⁶個のWM266-4細胞(ATCC CRL1676)より、インビトロジェン(Invitrogen)社製のmRNA抽出キットであるファーストラック(Fast Track; 商品番号K1593-02)を用いて、約30μgのmRNAを取得した。具体的試薬および方法はキットに付与されている説明書に従った。

【0098】(2) cDNAライブラリーの作製

上記で得られたmRNAの8μgから、インビトロジェン(Invitrogen)社製のcDNA合成キット(The Librarian I)を用いて、ランダム・プライマーをプライマーとして2本鎖cDNAを合成した。その後、cDNAの両末端にBstXIリンカーの代わりに、以下に示すSfiIリンカーを付与し、アガロースゲル電気泳動によりcDNAをサイズにより分画を行ない、約1.2kb以上のcDNA断片を回収した。

【0099】

【化4】

SfiIリンカー

5'-CTTTAGAGCAC-3' (11mer)

3'-GAAATCTC-5' (8mer)

【0100】上記SfiIリンカーの11mer(配列番号5)と8merの1本鎖DNAはそれぞれアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。合成したDNAはそれぞれ50μgずつ、別々にT4キナーゼ緩衝液50μlに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)30単位を加えて、37°Cで16時間リン酸化反応を行なった後使用した。具体的試薬および方法は、BstXIリンカーの代わりに、上記のSfiIリンカーを使用した以外は、キットに付与されている説明書に従った。また、直接発現クローニングベクター(Expression Cloning Vector)としては、1項の(15)で造成したpAMoPRC3Scを使用した。

【0101】pAMoPRC3Scの24μgをY-50緩衝液590μlに溶解し、80単位のSfiIを加え、37°Cで16時間消化反応を行なった。この反応液から5μlをとり、アガロースゲル電気泳動にかけて切断が完了したことを確認後、cDNAライブラリー造成時のcDNAインサートが挿入されていないクローンの量を減少させるため、40単位のBamHIを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約8.8kbのDNA断片を回収した。

【0102】上記で得られたpAMoPRC3Sc由来のSfiI断片(8.8kb)2μgとcDNA断片とをT4リガーゼ緩衝液250μlに溶解し、T4DNAリガーゼ2000単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。その後、トランスファーRNA(trRNA)5μgを添加し、エタノール沈殿後、TE緩衝液20μlに溶解した。該反応液を用いて大腸菌LE392株〔マニアティス(Maniatis)ら編集:モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 2.58, Cold Spring Harbor, 1989年刊行]をエ

レクトロポーレーション法 [ウィリアム・ジェイ・ドゥワー (William J. Dower) ら: *ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.)*, 16, 6127 (1988)] により形質転換し、約20万個のアンピシリン耐性株を得た。

【0103】上記で得られた約20万個のアンピシリン耐性株 (cDNAライブラリー) を混合した後、キアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである *plasmid maxi kit* (商品番号 41031) を用いてプラスミドを調製した。取得したプラスミドはエタノール沈殿後、1 μ g/ μ l になるように TE 緩衝液に溶解した。上記プラスミドは、エレクトロポーレーション法 [Miyaji ら: *サイトテクノロジー (Cytotechnology)*, 3, 133 (1990)] により、KJM-1 株に導入した。1.6 $\times 10^6$ 細胞あたり 4 μ g のプラスミドを導入した後、8ml の RPMI 1640・ITPSGF 培地に懸濁し、CO₂ インキュベーターで 37°C で 24 時間培養した。その後、G418 (ギブコ社製) を 0.5mg/ml になるように添加して、さらに 7 日培養し、形質転換株を得た。得られた形質転換株は、ヒマメレクチン 120 (50ng/ml) が含まれた RPMI 1640・ITPSGF 培地で、5 $\times 10^4$ 細胞/ml になるように懸濁し、96穴マイクロタイタープレートに 200 μ l ずつ分注した。

【0104】CO₂ インキュベーター中で 37°C で 4 週間培養した後、ヒマメレクチン 120 耐性株を取得した。その耐性株を培養した後、約 5 $\times 10^6$ の細胞からハート法 [ロバート・エフ・マーゴルスキー (Robert F. Margolske) ら: *モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)*, 8, 2837 (1988)] によりプラスミドを回収した。回収したプラスミドは、エレクトロポーレーション法 [ウィリアム・ジェイ・ドゥワー (William J. Dower) ら: *ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.)*, 16, 6127 (1988)] により大腸菌 LE392 株に導入し、アンピシリン耐性株を取得した。その形質転換株よりキアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットを用いてプラスミドを調製し、その構造を各種制限酵素で切断して調べたところ、約 1.8kb の cDNA を含んでいることが明らかとなった。この cDNA を含むプラスミドを pAMoPRWM1 と名付け、これを上記と同様の方法で再度 KJM-1 株に導入したところ、再びヒマメレクチン 120 耐性となったことから、この cDNA が β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子 (WM1) であると推定される。

【0105】4. β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子 (WM1) の塩基配列の決定

(1) β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子 (WM1) の pUC119 への組み込み (図 16 参照)

3項の (3) で得られた pAMoPRWM1 の 1 μ g を Y-100 緩衝液 30 μ l に溶解し、20 単位の Asp718 [ベ

ーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim) 社製] を加え、37°C で 2 時間消化反応を行なった。その後、5 単位の EcoRV を加え、さらに 37°C で 10 分間部分消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約 1.8kb の DNA 断片を回収した。

【0106】また、pUC119 [メッシング (Messing) ら: *メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology)*, 153, 3 (1987)] の 1 μ g を K-20 緩衝液 30 μ l に溶解し、20 単位の SmaI を加え、37°C で 2 時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が 100 mM になるように塩化ナトリウムを添加し、20 単位の Asp718 を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約 3.16kb の DNA 断片を回収した。

【0107】上記で得られた pAMoPRWM1 由来の EcoRV - Asp718 断片 (1.8kb) 0.05 μ g と pUC119 由来の SmaI - Asp718 断片 (3.16kb) 0.05 μ g とを T4 リガーゼ緩衝液 30 μ l に溶解し、T4DNA リガーゼ 175 単位を加えて、12°C で 16 時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌 HB101 株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドを pUC119-WM1 と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

(2) 塩基配列決定用欠失変異プラスミド (デレションプラスミド) の造成

3項の (1) で得られた pUC119-WM1 の 2 μ g を Y-150 緩衝液 30 μ l に溶解し、20 単位の BamHI と 20 単位の SphI を加え、37°C で 2 時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、Exo III 緩衝液 (宝酒造社製のキロシークエンス用デレションキットに添付されている) 100 μ l に溶解した。また、同プラスミド 2 μ g を Y-0 緩衝液 30 μ l に溶解し、20 単位の SacI を加え、37°C で 2 時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウム濃度が 150 mM になるように塩化ナトリウムを添加し、20 単位の NotI を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、Exo III 緩衝液 100 μ l に溶解した。

【0108】上記で得られた pUC119-WM1 由来の BamHI - SphI 断片および同プラスミド由来の SacI - NotI 断片より、宝酒造社製のキロシークエンス用デレションキットを用いてそれぞれ数十種の欠失変異プラスミドを作製した。具体的な試薬および方法はキットに付与されている説明書に従った。上記で得られたデレションプラスミドの塩基配列は、アプライド・バイオシステムズ社の塩基配列決定キット (Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit; 商品番号 401113) を用いて決定した。決定した塩基配列を配列番号 1 に示した。その結果、 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子 (WM1) は、326 アミノ酸からなるタンパク質をコー

ドしていることが明らかになった。またそのアミノ酸配列より、このタンパク質がグリコシルトランスフェラーゼ（以下、GTと略記する）に共通な構造を有することが明らかになった。すなわち、N末端の4アミノ酸を細胞質側に出し、それに続く22アミノ酸からなる疎水性に富む領域で膜に結合し、残りの大半のC末端部分（触媒部位を含む）をゴルジ体内腔に露出する構造をとっていると考えられる。

【0109】実施例2. 動物細胞によるβ1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの生産

1. β1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを動物細胞に発現させるためのプラスミドpAMoERWM1の造成

(1) pAGE147の造成 (図17参照)

pAGE107のSV40初期遺伝子プロモーターをモロニー・マウス白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート (long terminal repeat; LTR) のプロモーターにすげかえたプラスミドpAGE147の造成を以下のようにして行なった。

【0110】プラスミドpPMOL1 (特開平1-63394) の2μgをY-0緩衝液30μlに溶解し、20単位のSmaIを加え、30°Cで3時間消化反応を行った。その後、塩化ナトリウムを50mMになるように添加し、20単位のClaIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、モロニー・マウス白血病ウイルスのLTRプロモーターを含む約0.6kbのDNA断片を回収した。

【0111】次に、実施例1の1項の(8)で合成した下記の2種の合成DNA

【0112】

【化5】

5'-TCGAGGACC-3' (9 mer)

3'-CCTGGGC-5' (7 mer)

【0113】をそれぞれ25ピコモル(pmoles)ずつT4キナーゼ緩衝液10μlに溶解し、5単位のT4DNAキナーゼを加え、37°Cで30分間反応させることにより5'末端をリン酸化した。上記で得られたpPMOL1由来のClaI-SmaI断片(0.6kb)0.05μgと5'リン酸化された2種の合成DNA (1ピコモルずつ)とHindIIIリンカー(5'-pC AAGCTTG-3'; 宝酒造社製) (1ピコモル)とをT4リガーゼ緩衝液30μlに溶解し、T4DNAリガーゼ200単位を加え、12°Cで16時間結合反応を行った。エタノール沈殿により該DNA断片を回収した後、Y-100緩衝液に溶解し、10単位のHindIIIおよび10単位のXhoIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。反応をフェノールクロロホルム抽出により停止させ、エタノール沈殿により該DNA断片を回収した。

【0114】一方、pAGE107 (特開平3-22979、Miyajiら: サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 50

133 (1990)] の1μgを30μlのY-100緩衝液に溶解し、10単位のHindIIIと10単位のXhoIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、G418耐性遺伝子およびアンピシリン耐性遺伝子を含む約6.0kbのDNA断片を回収した。

【0115】上記で得られたpAGE107由来のHindIII-XhoI断片(6.0kb)0.3μgとpPMOL1由来のHindIII-XhoI断片(0.6kb)0.01μgとをT4リガーゼ緩衝液20μlに溶解し、T4DNAリガーゼ200単位を加え、12°Cで16時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAGE147と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0116】(2) pAGE247の造成 (図18参照)

pAGE207のSV40初期遺伝子プロモーターをモロニー・マウス白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート (long terminal repeat: LTR) のプロモーターにすげかえたプラスミドpAGE247の造成を以下のようにして行なった。

【0117】(1) で得られたpAGE147の2μgを30μlのY-100緩衝液に溶解し、10単位のHindIIIと10単位のXhoIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、モロニー・マウス白血病ウイルスのLTRプロモーターを含む約0.63kbのDNA断片を回収した。一方、実施例1の1項の(11)で構築したpAGE207の2μgを30μlのY-100緩衝液に溶解し、10単位のHindIIIと10単位のXhoIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、hyg耐性遺伝子およびアンピシリン耐性遺伝子を含む約5.84kbのDNA断片を回収した。

【0118】上記で得られたpAGE147由来のHindIII-XhoI断片(0.63kb)0.05μgとpAGE207由来のHindIII-XhoI断片(5.84kb)0.1μgをT4リガーゼ緩衝液30μlに溶解し、T4DNAリガーゼ100単位を加え、12°Cで16時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAGE247と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0119】(3) pAMN6hygの造成 (図19参照)

モロニー・マウス白血病ウイルスのLTRをプロモーターとし、hyg耐性遺伝子をマーカーとして有する、ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の発現プラスミドpAMN6hygの造成を以下のようにして行なった。

【0120】上記で得られたpAGE247の2 μ gをY-50緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のClaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行った。その後、塩化ナトリウムを175mMになるように添加し、20単位のSalIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、モロニー・マウス白血病ウイルスのLTRプロモーター、アンピシリン耐性遺伝子およびhyg耐性遺伝子を含む約4.8kbのDNA断片を回収した。

【0121】一方、特開平2-227075記載の方法により得られたプラスミドpASN6の2 μ gをY-50緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のClaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行った。その後、塩化ナトリウムを175mMになるように添加し、20単位のSalIと20単位のMluIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体遺伝子を含む約5.0kbのDNA断片を回収した。

【0122】上記で得られたpAGE247由来のClaI-SalI断片(4.8kb) 0.1 μ gとpASN6由来のClaI-SalI断片(5.0kb) 0.1 μ gとをT4リガーゼ緩衝液20 μ lに溶解し、T4DNAリガーゼ200単位を加え、12°Cで16時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMN6hygと名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0123】(4) pAMoERSAの造成 (図20参照)

任意のタンパク質が、プロテインAの免疫グロブリンG(IgG)と黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)が結合する領域との融合タンパク質として分泌発現するためのベクターpAMoERSAの造成を以下のようにして行なった。

【0124】(3)で得られたpAMN6hygの2 μ gをY-50緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のSnaBIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。その後、塩化ナトリウムを100mMになるように添加し、20単位のXbaIを加えて37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、ヒト顆粒球コロニー刺激因子のシグナル配列を含む約0.33kbのDNA断片を回収した。

【0125】また、pPrAS1[Saitoら:プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 2, 481(1989)]の2 μ gをY-50緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のClaIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。エタノール沈殿後、30 μ lのDNAポリメラーゼI緩衝液に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラー

ゼI・クレノー断片を加え、37°Cで60分間反応させ、ClaI消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿後、Y-100緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、プロテインAのIgGとの結合領域を含む約0.21kbのDNA断片を回収した。

【0126】また、実施例1の1項の(13)で得られたpAMoERC3Scの2 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶解し、20単位のXbaIと20単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約12.1kbのDNA断片を回収した。上記で得られたpAMN6hyg由来のSnaBI-XbaI断片(0.33kb) 0.05 μ gとpPrAS1由来のClaI(blunt)-BamHI断片(0.21kb) 0.05 μ gとpAMoERC3Sc由来のXbaI-BamHI断片(12.1kb) 0.1 μ gとをT4リガーゼ緩衝液30 μ lに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12°Cで16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoERSAと名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0127】(5) pAMoERSAW1の造成 (図21参照)

クローン化した β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼはその一次配列から、N末の4アミノ酸を細胞質側に出し、それに続く22アミノ酸からなる疎水性に富む領域で膜に結合し、残りの大半のC末部分(触媒部位を含む)をゴルジ体内腔に露出する構造をとると推定される。そこで、以下のようにして膜結合領域と推定される部分を除去し、代わりにヒト顆粒球コロニー刺激因子のシグナル配列およびプロテインAのIgGとの結合領域を付加することにより β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを生産させた。

【0128】膜結合領域と推定される部分[配列番号1の35番目のSerから326番目のCysまで]以降をコードするDNAをPCR法を用いて調製し、上記(4)で造成した分泌発現ベクターpAMoERSAに組み込んだ。PCR用のプライマーとして、以下に示す2種の合成DNA[W-AN(40mer;配列番号6)およびW-C(39mer;配列番号7)]をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

【0129】

【化6】

37

W-AN (40mer)

5'-CTCACTGCGCAGGCCTCCAAACCATTAGCCACCTAACAG-3'

W-C (39mer)

5'-GTCAACGGTACCATCCTAACATCTGAGATGTTCTTGCT-3'

【0130】W-ANには *Stu*I サイトが、W-Cには *Asp*718 サイトがそれぞれ導入されるように構築されているため、PCR法で増幅されたDNA断片は *Stu*I と *Asp*718 で切断した後に、pAMoERSAの*Stu*I切断部位と *Asp*718切断部位間に組み込むことができる。PCR反応は、宝酒造社製のキット (GeneAmp™NA Amplification Reagent Kit with AmpliTaq™ Recombinant Taq DNA Polymerase) を用いて行なった。反応液の調製はキットに添付の説明書に従って行ない、パーキン・エルマー・シータス社のサーマル・サイクラー (PERKIN ELMER Cetus DNA Thermal Cycler ; 宝酒造社が販売) を用いて、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で3分間の反応を30サイクル行なった後、さらに72℃で7分間反応させた。鋳型としては、1ngのプラスミドpUC119-WM1を使用した。反応終了後、クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なった後、Y-100緩衝液30μlに溶解し、20単位の*Stu*Iおよび20単位の *Asp*718を加え、37℃で2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約0.89kbのDNA断片を回収した。

【0131】また、pAMoERSAの2μgをY-100緩衝液30μlに溶解し、20単位の*Stu*Iと20単位の *Asp*718を加え、37℃で2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約11.8kbのDNA断片を回収した。上記で得られたPCR法で増幅したDNA由来の *Stu*I - *Asp*718断片(0.89kb)0.1μg と pAMoERSA由来の *Stu*I - *Asp*718断片(11.8kb)0.1μg とをT4リガーゼ緩衝液30μlに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、12℃で16時間結合反応を行なった。該反応液を用いて大腸菌HB101株をコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法に従ってプラスミドを単離した。このプラスミドをpAMoERSAW1と名付け、その構造を制限酵素消化により確認した。

【0132】2. ナマルバKJM-1細胞を宿主としたβ1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの分泌発現
上記1項の(4)および(5)で得られたプラスミドpAMoERSA (分泌発現ベクター ; コントロール) およびpAMoERSAW1 (β1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ分泌発現用プラスミド) をキアジエン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである>plasmid<maxi kit (商標番号 41031)を用いて調製した。取得したプラスミドはエタノール沈殿後、1μg/μlになる

38

ようにTE緩衝液に溶解した。その後、両プラスミドを、エレクトロポレーション法 [Miyajiri: サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により、それぞれナマルバKJM-1株に導入した。1.6 × 10⁶ 細胞あたり4μgのプラスミドを導入後、8mlのRPMI 1640・ITPSGF培地に懸濁し、CO₂ インキュベーターで37℃で24時間培養した。その後、G418 (ギブコ社製) を0.5mg/mlになるように添加して7日間培養した。その後、22mlのRPMI 1640・ITPSGF培地 (0.5mg/mlのG418を含む) を添加し、さらに5日間培養し形質転換株を得た。取得した形質転換株は、それぞれG418を0.5mg/ml含むRPMI 1640・ITPSGF培地30mlに5 × 10⁴ 細胞/mlになるように懸濁し、CO₂ インキュベーターで37℃で8日間培養した。その後、遠心分離 (160 × g、10分間) により細胞を除き上清を回収し、再度遠心分離 (1500 × g、10分間) 後、その上清を回収した。このようにして取得した培養上清は、使用するまで -80℃で保存した。

【0133】プラスミドpAMoERSAW1がコードするタンパク質は、プロテインAがIgGと結合する領域との融合タンパクとして分泌発現されるため、IgGセファロース (Sephacrose) を用いて、容易に精製することができる。そこで、上記で取得した培養上清にアジ化ナトリウムを最終濃度0.1%になるように添加した後、添付の説明書にしたがって前処理したIgGセファロース [ファルマシア (Pharmacia) 製] を100μl添加し、4℃で一晩緩やかに攪拌した。その後、遠心分離 (160 × g、10分間) によりIgGセファロースを回収し、RPMI 1640・ITPSGF培地1mlで3回洗浄後、このIgGセファロース5μlを直接用いて、シアリルトランスフェラーゼ活性、フコシルトランスフェラーゼ活性およびガラクトシルトランスフェラーゼ活性を測定した。シアリルトランスフェラーゼ活性の測定は30μlのアッセイ溶液 [0.1M カコジル酸-塩酸 (pH6.5), 0.01M 塩化マンガン, 0.45% トライトンX-100 (Triton X-100), 0.1mM 基質, 上記IgGセファロース(5μl), 5mM CMP-シアル酸 (添加あるいは無添加)] 中で37℃、2時間の反応を行った後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生産物を分離・同定することにより行なった。基質糖鎖としてはラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose ; LNnT) およびラクト-N-テトラオース (Lacto-N-tetraose ; LNT) (いずれもオックスフォード・グライコシステムズ社製) をアミ、

ノビリジンで蛍光標識したものを使用した。基質の蛍光標識は、常法 [Akihiro Kondo ら: アグリカルチュラル・アンド・バイオリジカル・ケミストリー (Agric. Bio l. Chem.), 54, 2169 (1990)] に従って行なった。それぞれの I g G セファロースについて、CMP-シアル酸 (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応を行った後、HPLC で解析し、CMP-シアル酸を含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。反応の終了したアッセイ溶液は、100 °C、5 分間の熱処理を行った後、10000 × g で 10 分間遠心分離し、その上清のうち 10 μl を HPLC に供した。HPLC は、TSK gel ODS-80TM カラム (4.6mm × 30cm; 東ソー社製) を使用し、溶出温度 50°C、流速 1ml/分の条件で 0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.0) を用いて溶出を行なった。生成物の検出は、島津製作所製の蛍光検出器 (Fluorescence HPLC Monitor RF-535T) を用いて行なった (励起波長 320nm、放射波長 400nm)。測定の結果、いずれの I g G セファロースもシアリルトランスフェラーゼ活性は検出されなかった。

【0134】フコシルトランスフェラーゼ活性の測定は、常法 [ロウ (John. B. Lowe) ら: ジーンズ・アンド・ディベラプメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)] に従って以下のように行なった。30 μl のアッセイ溶液 [50mM 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸 (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; MOPS) (pH6.5), 25mM 塩化マンガン, 5mM ATP, 6 μM GDP-[¹⁴C] フコース (60,000 cpm /アッセイ), 2.0mM 基質, 上記 I g G セファロース (5 μl)] 中で 37°C、2 時間反応させた後、30 μl のエタノールを加えて反応を停止させた。ついで、750 μl の水を加え遠心分離 (15,000g, 5分) 後、その上清を Dowex-1 を用いたクロマトグラフィーに供し、通過画分を集めた。その後、750 μl の水で再度カラムを洗浄し、先の通過画分と合わせて液体シンチレーターにより放射活性を測定した。基質糖鎖としてはラクトー-N-ネオテトラオース、ラクトー-N-テトラオースおよびシアリルラクトー-N-テトラオース (Sialyllacto-N-tetraose; IV^{NeuAc}-LcOse4) (いずれもオックスフォード・グライコシステムズ社製) を使用した。測定の結果、いずれの I g G セファロースもフコシルトランスフェラーゼ活性は検出されなかった。

【0135】ガラクトシルトランスフェラーゼ活性の測定は 30 μl のアッセイ溶液 [120mM トリス塩酸 (pH7.9), 10mM 塩化マンガン, 0.45% トライトン X-100, 2mM β-メルカプトエタノール, 0.1mM 基質, 上記 I g G セファロース (5 μl), 5mM UDP-ガラクトース (添加あるいは無添加)] 中で 37°C、2 時間反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生成物を分離・同定することにより行なった。基質糖鎖としては、上記で調製したアミノビリジンで蛍光標識したラクトー-N-ネオテトラオースを β-ガラクトシダーゼ処理して末端のガラ

クトース残基を除去したものを使用した。具体的には約 60nmol のアミノビリジンで蛍光標識したラクトー-N-ネオテトラオースに対し、100 ミリユニットの β-ガラクトシダーゼ (生化学工業) を加え、37°C で 16 時間反応後、100 °C で 5 分間の熱処理により β-ガラクトシダーゼを失活させたものを基質糖鎖として使用した。それぞれの I g G セファロースについて、UDP-ガラクトース (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応を行った後、HPLC で解析し、UDP-ガラクトースを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。反応が終了したアッセイ溶液は、100 °C で 5 分間の熱処理を行った後、10000 × g で 10 分間遠心分離し、その上清のうち 10 μl を HPLC に供した。HPLC は、TSK gel ODS-80TM カラム (4.6mm × 30cm; Tosoh 社製) を使用し溶出温度 50°C、流速 1ml/分の条件で、0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.0) を用いて溶出を行なった。生成物の検出は、島津製作所製の蛍光検出器 (Fluorescence HPLC Monitor RF-535T) を用いて行なった (励起波長 320nm、放射波長 400nm)。生成物の同定は、スタンダード [アミノビリジンで蛍光標識したラクトー-N-ネオテトラオース (LNT) またはラクトー-N-ネオテトラオース] と溶出時間を比較することにより行なった。HPLC の結果を図 22 に示す。pAMoERSAW1 を導入したナマルバ細胞の培養上清由来の I g G セファロースを使用した場合には、アミノビリジンで蛍光標識した LNT と同じ位置に生成物のピークが検出された。一方、ベクターである pAMoERSA を導入したナマルバ細胞の培養上清由来の I g G セファロースを使用した場合は、生成物は検出されなかった。

【0136】以上の結果から、クローン化した遺伝子 (W M1) が β1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードしていることが明らかとなった。また、β1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼが、プロテイン A が I g G と結合する領域との融合タンパク質として培養上清中に分泌生産されること、およびその分泌生産物が I g G セファロースを用いて容易に回収、精製されることが示された。

【0137】実施例 3. β1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ発現プラスミドを導入した KJM-1 株におけるシアリル・ルイス a (Sialyl Lewis-a) 糖鎖の合成 実施例 2 で得られた pAMoPRWM1 (β1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ発現プラスミド)、または pAMoPRC3Sc (コントロールプラスミド) を導入した KJM-1 株を、G418 を 0.5mg/ml 含む RPMI 1640・ITPSGF 培地で培養した後、それぞれ約 1 × 10⁶ 個の細胞をマイクロチューブ (1.5ml: エッペンドルフ社製) にとり、遠心分離 (550 × g, 7 分間) により細胞を集めた。ついで、0.1% のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水液 (8 g/l 塩化ナトリウム, 0.

2 g/l 塩化カリウム, 1.15 g/l 無水リン酸2水素ナトリウム, 0.2 g/lリン酸2水素カリウム, 0.1% アジ化ナトリウム; 以下、A-PBSと略記する) 1ml で細胞の洗浄を行なった。ついで、集めた細胞に対し、シアリル・ルイスa糖鎖に対する抗体であるKM231〔花井ら: アンチキャンサー・リサーチ (Anticancer Res.), 10, 1579 (1990)〕を用いて、以下のようにして間接蛍光抗体染色を行ない、これらの細胞におけるシアリル・ルイスa糖鎖の発現を調べた。

【0138】集めた細胞に対しKM231をそれぞれ50 10 μ l (10 μ g / ml) 加えて懸濁し、4 °Cで1時間反応させた。ついで、細胞をA-PBSで3回洗浄した後、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)で蛍光標識した抗マウスIgG抗体およびIgM抗体(カッペル社製、A-PBSで16倍希釈して使用) 20 μ l を加えて懸濁し、4 °Cで30分間反応させた。ついで、細胞をA-PBSで3回洗浄した後、再度A-PBSに懸濁し、エピックス・エリート・フローサイトメーター [EPICSElite Flow Cytometer; コールター (COULTER) 社製] で解析を行なった。対照として、KM231の代わりに正常マウス血清 (A-PBSで500 倍希釈して使用) を用いて上記と同様に解析を行なった。

【0139】結果を図23に示す。直接発現クローニングベクターpAMoPRC3Sc (コントロールプラスミド) を導入したKJM-1株において、KM231で染色した細胞の蛍光強度は、対照の蛍光強度と比較して強かった。このことは、KJM-1株がもともとシアリル・

ル・ルイスa糖鎖を発現していることを示している。また、KM231による染色処理を施したpAMoPRWM1 (β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ発現プラスミド) を含有するKJM-1株の蛍光強度は、KM231による染色処理を施したpAMoPRC3Sc (コントロールプラスミド) を含有するKJM-1株の蛍光強度よりさらに強くなっていた。このことは、WM1がコードする β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼが、細胞内でシアリル・ルイスa糖鎖の合成に関与していることを示している。

【0140】

【発明の効果】本発明により、有用生理活性を有する糖鎖とその修飾物の製造および有用生理活性タンパク質に結合している糖鎖の改良に有用な新規 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼが提供される。

【0141】

【配列表】

配列番号: 1
配列の長さ: 1739
配列の型: 核酸
鎖の数: 二本鎖
配列の種類: cDNA to mRNA
起源:
生物名: ヒト
株名: WM266-4細胞
細胞の種類: メラノーマ

配列:

GCGGCCGAGA GAGCGGAGCA CGAGGAGGCG GGGCGGCGAG AGAAGTGATG CTGGCGCCGG	60
GGATCGGGGC AGCGGCAGCG GAGCAGCAGC ATCTTCGGGA CCCTGGCTGC AGCGTCCCTG	120
TGGCCCGCGC GCCAGCCAG CGGCCGAGA CCACGCGCCC CGCGGACCCA TTAGAAACGC	180
TTCAAGAGCT GCTCAGTCCA GGAGTGGAGG GATTTGTGA AGACACAGAT GCTCCCTAAA	240
AGGAGTGCAG AAATTTTCAT CATAGGTTCT CTTGCTGTGC TGCTGGGTCC TCAGAAGTGT	300
TCTGGAGATC GCCTCTTTGA AAGCGGCTAC GCAGCTTGCT CCTGGCACGG GCACCTTGAA	360
TCTCCTCCTC ACACAGATGG AGACCATGCT TGATTCCCTG AACTTGTAGT AAGAAGAAG	420
AAAACACAGC ACGCTGGAGC CAACAGAGTT AAGAGGAAGA TTTATGAGTC ATGGAACCTT	480
CCATCAGATT TGAAGAAG TAGAATGAGC GCAGAGGTGA CAGACAGCCA CTGAGGCCCA	540
TGGACAATCT CCACCTCAGC CTTCTCTATC AAACCTGAAG ATTTATTAGT AATATGCTGC	600
CTTTGGAAGA TGAACAACA CTAGTGCCAA GGAGGCGTAT TCTTCAATAT TTGGAATAGA	660
CGTGTTCACA AGACA ATG GCT TCA AAG GTC TCC TGT TTG TAT GTT TTG ACA	711
Met Ala Ser Lys Val Ser Cys Leu Tyr Val Leu Thr	
1 5 10	
GTT GTG TGC TGG GCC AGC GCT CTC TGG TAC TTG AGT ATA ACT CGC CCT	759
Val Val Cys Trp Ala Ser Ala Leu Trp Tyr Leu Ser Ile Thr Arg Pro	
15 20 25	
ACT TCT TCT TAC ACT GGC TCC AAA CCA TTC AGC CAC CTA ACA GTT GCC	807
Thr Ser Ser Tyr Thr Gly Ser Lys Pro Phe Ser His Leu Thr Val Ala	
30 35 40	
AGG AAA AAC TTC ACC TTT GGC AAC ATA AGA ACT CGA CCT ATC AAC CCA	855
Arg Lys Asn Phe Thr Phe Gly Asn Ile Arg Thr Arg Pro Ile Asn Pro	

43			44
45	50	55	60
CAT TCT TTT GAA TTT CTT ATC AAC GAG CCC AAT AAA TGT GAG AAA AAC			903
His Ser Phe Glu Phe Leu Ile Asn Glu Pro Asn Lys Cys Glu Lys Asn			
65	70	75	
ATT CCT TTT CTT GTT ATC CTC ATC AGC ACC ACT CAC AAG GAA TTT GAT			951
Ile Pro Phe Leu Val Ile Leu Ile Ser Thr Thr His Lys Glu Phe Asp			
80	85	90	
GCC CGT CAG GCA ATC AGA GAG ACG TGG GGG GAT GAG AAC AAC TTT AAG			999
Ala Arg Gln Ala Ile Arg Glu Thr Trp Gly Asp Glu Asn Asn Phe Lys			
95	100	105	
GGG ATC AAG ATA GCC ACC CTG TTC CTC CTG GGC AAG AAT GCT GAT CCT			1047
Gly Ile Lys Ile Ala Thr Leu Phe Leu Leu Gly Lys Asn Ala Asp Pro			
110	115	120	
GTT CTC AAT CAG ATG GTG GAG CAA GAG AGC CAA ATC TTC CAT GAT ATC			1095
Val Leu Asn Gln Met Val Glu Gln Glu Ser Gln Ile Phe His Asp Ile			
125	130	135	140
ATC GTG GAG GAC TTT ATT GAC TCC TAC CAT AAC CTT ACC CTC AAA ACA			1143
Ile Val Glu Asp Phe Ile Asp Ser Tyr His Asn Leu Thr Leu Lys Thr			
145	150	155	
TTA ATG GGG ATG AGA TGG GTG GCC ACT TTT TGT TCA AAA GCC AAG TAT			1191
Leu Met Gly Met Arg Trp Val Ala Thr Phe Cys Ser Lys Ala Lys Tyr			
160	165	170	
GTC ATG AAA ACA GAC AGC GAC ATT TTT GTA AAC ATG GAC AAT CTT ATT			1239
Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Ile Phe Val Asn Met Asp Asn Leu Ile			
175	180	185	
TAT AAA TTA CTG AAA CCC TCC ACC AAG CCA CGA AGA AGG TAT TTT ACT			1287
Tyr Lys Leu Leu Lys Pro Ser Thr Lys Pro Arg Arg Arg Tyr Phe Thr			
190	195	200	
GGC TAT GTC ATT AAT GGA GGA CCG ATT CGG GAT GTC CGC AGT AAG TGG			1335
Gly Tyr Val Ile Asn Gly Gly Pro Ile Arg Asp Val Arg Ser Lys Trp			
205	210	215	220
TAT ATG CCC AGG GAT TTG TAC CCA GAC AGT AAC TAC CCA CCT TTC TGT			1383
Tyr Met Pro Arg Asp Leu Tyr Pro Asp Ser Asn Tyr Pro Pro Phe Cys			
225	230	235	
TCG GGG ACT GGC TAC ATC TTT TCA GCC GAT GTA GCT GAA CTC ATT TAC			1431
Ser Gly Thr Gly Tyr Ile Phe Ser Ala Asp Val Ala Glu Leu Ile Tyr			
240	245	250	
AAG ACC TCA CTC CAC ACA AGG CTG CTT CAC CTT GAA GAC GTA TAT GTG			1479
Lys Thr Ser Leu His Thr Arg Leu Leu His Leu Glu Asp Val Tyr Val			
255	260	265	
GGA CTG TGT CTT CGA AAG CTG GGC ATA CAT CCT TTC CAG AAC AGT GGC			1527
Gly Leu Cys Leu Arg Lys Leu Gly Ile His Pro Phe Gln Asn Ser Gly			
270	275	280	
TTC AAT CAC TGG AAA ATG GCC TAC AGT TTG TGT AGG TAT CGC CGA GTT			1575
Phe Asn His Trp Lys Met Ala Tyr Ser Leu Cys Arg Tyr Arg Arg Val			
285	290	295	300
ATC ACT GTG CAT CAG ATC TCT CCA GAA GAA ATG CAC AGA ATC TGG AAT			1623
Ile Thr Val His Gln Ile Ser Pro Glu Glu Met His Arg Ile Trp Asn			
305	310	315	
GAC ATG TCA AGC AAG AAA CAT CTC AGA TGT TAG GATTTTACC AATGTAAATA			1676

45

46

Asp Met Ser Ser Lys Lys His Leu Arg Cys TER

320

325

TGTTTCTTTT CTTTTTTTAA GAAATGGGAC CTAAGGTGTT GGTATTTTCC AGGTGTCGGG 1736

GGG

1739

【0142】配列番号: 2

*起源:

配列の長さ: 326

生物名: ヒト

配列の型: アミノ酸

株名: WM266-4 細胞

トポロジー: 直鎖状

細胞の種類: メラノーマ

配列の種類: タンパク質

*

配列:

Met Ala Ser Lys Val Ser Cys Leu Tyr Val Leu Thr Val Val Cys Trp

1

5

10

15

Ala Ser Ala Leu Trp Tyr Leu Ser Ile Thr Arg Pro Thr Ser Ser Tyr

20

25

30

Thr Gly Ser Lys Pro Phe Ser His Leu Thr Val Ala Arg Lys Asn Phe

35

40

45

Thr Phe Gly Asn Ile Arg Thr Arg Pro Ile Asn Pro His Ser Phe Glu

50

55

60

Phe Leu Ile Asn Glu Pro Asn Lys Cys Glu Lys Asn Ile Pro Phe Leu

65

70

75

80

Val Ile Leu Ile Ser Thr Thr His Lys Glu Phe Asp Ala Arg Gln Ala

85

90

95

Ile Arg Glu Thr Trp Gly Asp Glu Asn Asn Phe Lys Gly Ile Lys Ile

100

105

110

Ala Thr Leu Phe Leu Leu Gly Lys Asn Ala Asp Pro Val Leu Asn Gln

115

120

125

Met Val Glu Gln Glu Ser Gln Ile Phe His Asp Ile Ile Val Glu Asp

130

135

140

Phe Ile Asp Ser Tyr His Asn Leu Thr Leu Lys Thr Leu Met Gly Met

145

150

155

160

Arg Trp Val Ala Thr Phe Cys Ser Lys Ala Lys Tyr Val Met Lys Thr

165

170

175

Asp Ser Asp Ile Phe Val Asn Met Asp Asn Leu Ile Tyr Lys Leu Leu

180

185

190

Lys Pro Ser Thr Lys Pro Arg Arg Arg Tyr Phe Thr Gly Tyr Val Ile

195

200

205

Asn Gly Gly Pro Ile Arg Asp Val Arg Ser Lys Trp Tyr Met Pro Arg

210

215

220

Asp Leu Tyr Pro Asp Ser Asn Tyr Pro Pro Phe Cys Ser Gly Thr Gly

225

230

235

240

Tyr Ile Phe Ser Ala Asp Val Ala Glu Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Leu

245

250

255

His Thr Arg Leu Leu His Leu Glu Asp Val Tyr Val Gly Leu Cys Leu

260

265

270

Arg Lys Leu Gly Ile His Pro Phe Gln Asn Ser Gly Phe Asn His Trp

275

280

285

Lys Met Ala Tyr Ser Leu Cys Arg Tyr Arg Arg Val Ile Thr Val His

290

295

300

Gln Ile Ser Pro Glu Glu Met His Arg Ile Trp Asn Asp Met Ser Ser

305

310

315

320

Lys Lys His Leu Arg Cys TER
325 326

【0143】配列番号：3

配列の長さ：52

配列の型：核酸

配列

TCGACAAGCT TGATATCGGC CTGTGAGGCC TCACTG6CCG CGGCCGCGGT AC 52

【0144】配列番号：4

配列の長さ：44

配列の型：核酸

配列

CGCGGCCGCG GCCAGTGAGG CCTCACAGGC CGATATCAAG CTTG 44

【0145】配列番号：5

配列の長さ：11

配列の型：核酸

配列

CTTTAGAGCA C 11

【0146】配列番号：6

配列の長さ：40

配列の型：核酸

配列

CTCACTGCGC AGGCCTCCAA ACCATTGAGC CACCTAACAG 40

【0147】配列番号：7

配列の長さ：39

配列の型：核酸

配列

GTCACCGGTA CCATCCTAAC ATCTGAGATG TTTCTTGCT 39

【図面の簡単な説明】

【図1】は、プラスミドpAGE106の造成工程を示す図である。

【図2】は、プラスミドpASLB3-3-1の造成工程を示す図である。

【図3】は、プラスミドpASLB3-3の造成工程を示す図である。

【図4】は、プラスミドpASLBE3-3の造成工程を示す図である。

【図5】は、プラスミドpASLBCの造成工程を示す図である。

【図6】は、プラスミドpASLBECの造成工程を示す図である。

【図7】は、プラスミドpASLBEC2の造成工程を示す図である。

【図8】は、プラスミドpAmoEC2の造成工程を示す図である。

【図9】は、プラスミドpAmoEC3の造成工程を示す図である。

【図10】は、プラスミドpAmoERC3の造成工程を示す図である。

【図11】は、プラスミドpAGE207の造成工程を示す図である。

*鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

★鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

☆20 配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【図12】は、プラスミドpAGE207ScNの造成工程を示す図である。

30 【図13】は、プラスミドpAmoC3Scの造成工程を示す図である。

【図14】は、プラスミドpAmoERC3Scの造成工程を示す図である。

【図15】は、プラスミドpAmoPRC3Scの造成工程を示す図である。

【図16】は、プラスミドpUC119-WM1の造成工程を示す図である。

【図17】は、プラスミドpAGE147の造成工程を示す図である。

40 【図18】は、プラスミドpAGE247の造成工程を示す図である。

【図19】は、プラスミドpAMN6hygの造成工程を示す図である。

【図20】は、プラスミドpAmoERSAの造成工程を示す図である。

【図21】は、プラスミドpAmoERSAW1の造成工程を示す図である。

【図22】は、HPLCを用いたガラクトシルトランスフェラーゼ活性測定の結果を示す図である。a、bはpAmoERSAW1 (β1,3-ガラクトシルトランスフェラー

ゼ発現用プラスミド)を導入したKJM-1株の培養上清よりIgGセファロースにより精製した β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼのガラクトシルトランスフェラーゼ活性を測定した際のHPLCパターンである。c、dはpAmoERSA(コントロールプラスミド)を導入したKJM-1株の培養上清について同様の操作を行った場合のHPLCパターンである。a、cは糖供与体であるUDP-ガラクトースを含まないアッセイ溶液を用いた時のHPLCパターンである。アミノピリジンで蛍光標識したラクト-N-テトラオースおよびラクト-N-ネオテトラオースの溶出時間をそれぞれ矢印1、2として図中に示した。

【図23】は、間接蛍光抗体染色後、エピックス・エリート・フローサイトメーター[EPICS Elite Flow Cytometer; コールター(COULTER)社製]で解析を行なった結果を示す図である。pAmoPRC3Sc(コントロールプラスミド)を導入したKJM-1株について、正常マウス血清を用いて間接蛍光抗体染色を行なった結果を対照として示した。また、pAmoPRC3Sc(コントロールプラスミド)あるいはpAmoPRWM1(β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ発現プラスミド)を導入したKJM-1株についてKM231を用いて間接蛍光抗体染色を行なった結果をそれぞれpAmoPRC3Sc、pAmoPRWM1として示した。

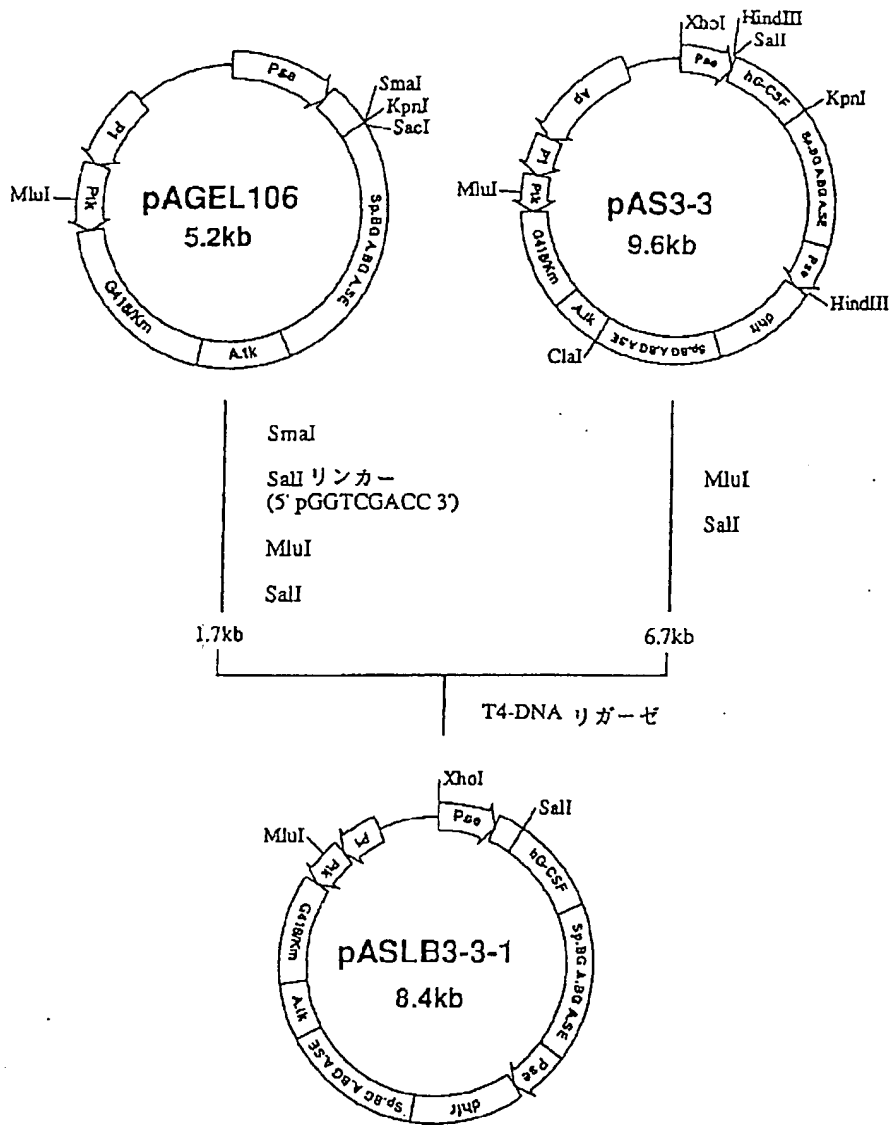
【符号の説明】

dhfr : ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子
hG-CSF : ヒト顆粒球コロニー刺激因子遺伝子
bp : 塩基対 (base pairs)
kb : キロ塩基対 (kilobase pairs)
G418 / Km : トランスポゾン5 (Tn5) 由来G418、カナマイシン耐性遺伝子
hyg : ハイグロマイシン耐性遺伝子
Ap : pBR322由来アンピシリン耐性遺伝子
Tc : pBR322由来テトラサイクリン耐性遺伝子
P1 : pBR322由来P1プロモーター
Ptk : ヘルペス・シンプレックス・ウイルス

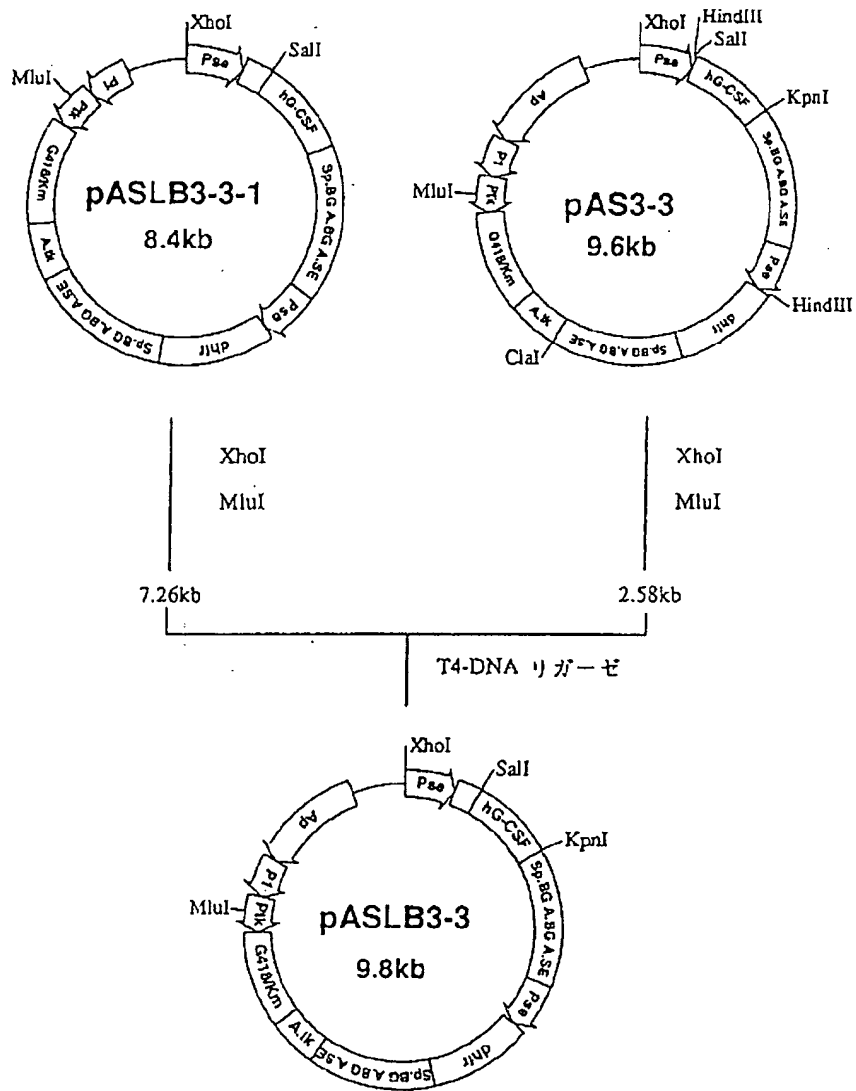
(Herpes simplexvirus; HSV)チミジンキナーゼ(tk)遺伝子プロモーター
Sp. β G : ラビット β グロビン遺伝子プライミングシグナル
A. β G : ラビット β グロビン遺伝子ポリA付加シグナル
A. SE : シミアン・ウィルス (simian virus) 40 (SV40) 初期遺伝子ポリA付加シグナル
Atk : ヘルペス・シンプレックス・ウィルス (Herpes simplex virus; HSV) チミジンキナーゼ(tk)遺伝子のポリA付加シグナル
Pse : シミアン・ウィルス (simian virus) 40 (SV40) 初期遺伝子プロモーター
Pmo : モロニー・マウス白血病ウィルスのロング・ターミナル・リピート (long terminal repeat : LTR) プロモーター
HTLV-1 : ヒトT細胞白血病ウィルス(human T-cell leukemia virus type-1 : HTLV-1)遺伝子
EBNA-1 : エプシュタイン・バー・ウィルス (Epstein-Barr virus) のEBNA-1遺伝子
oriP : エプシュタイン・バー・ウィルス (Epstein-Barr virus) の複製開始点
ori : pUC119の複製開始点
lac'Z : 大腸菌の β ガラクトシダーゼ遺伝子の一部
IG : M13 ファージDNA のインタージェニック領域(intergenicregion)
G-CSF der. : ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の遺伝子
S : ヒト顆粒球コロニー刺激因子のシグナルペプチドをコードする遺伝子部分
A またはProA : 黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus) のプロテインAのIgGとの結合領域をコードする遺伝子部分
WM1 : WM266-4細胞より取得した β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子 (全長あるいは活性領域部分の遺伝子)

The figure shows three plasmid maps and a DNA ligation strategy.
pAGE106 (5.0kb): A circular plasmid with a Pse site, BglI and BamHI sites, an ori (origin of replication), a Plk site, a Cm^r (chloramphenicol resistance) gene, and an A.tk site.
pATK03 (10.5kb): A circular plasmid with multiple BanII sites, a Sau3AI site, an HIV-1 site, and a Cm^r gene.
pAGEL106 (5.2kb): A circular plasmid with a Pse site, SmaI, KpnI, and SacI sites, an ori, a Plk site, a Cm^r gene, and an A.tk site.
DNA Ligation Strategy: A linear DNA fragment is shown with BglI and BamHI sites on one end (4.9kb) and a BanII site on the other (0.4kb). A smaller fragment with a BanII site (0.27kb) and a Sau3AI site is also shown. The strategy involves using T4-DNA リガーゼ (T4 DNA ligase) to join these fragments. The sequence 5' CGGGCT 3' and 3' GGAGC 5' are indicated near the BanII site. The text 'T4ポリヌクレオチド キナーゼ' (T4 polynucleotide kinase) is also present.

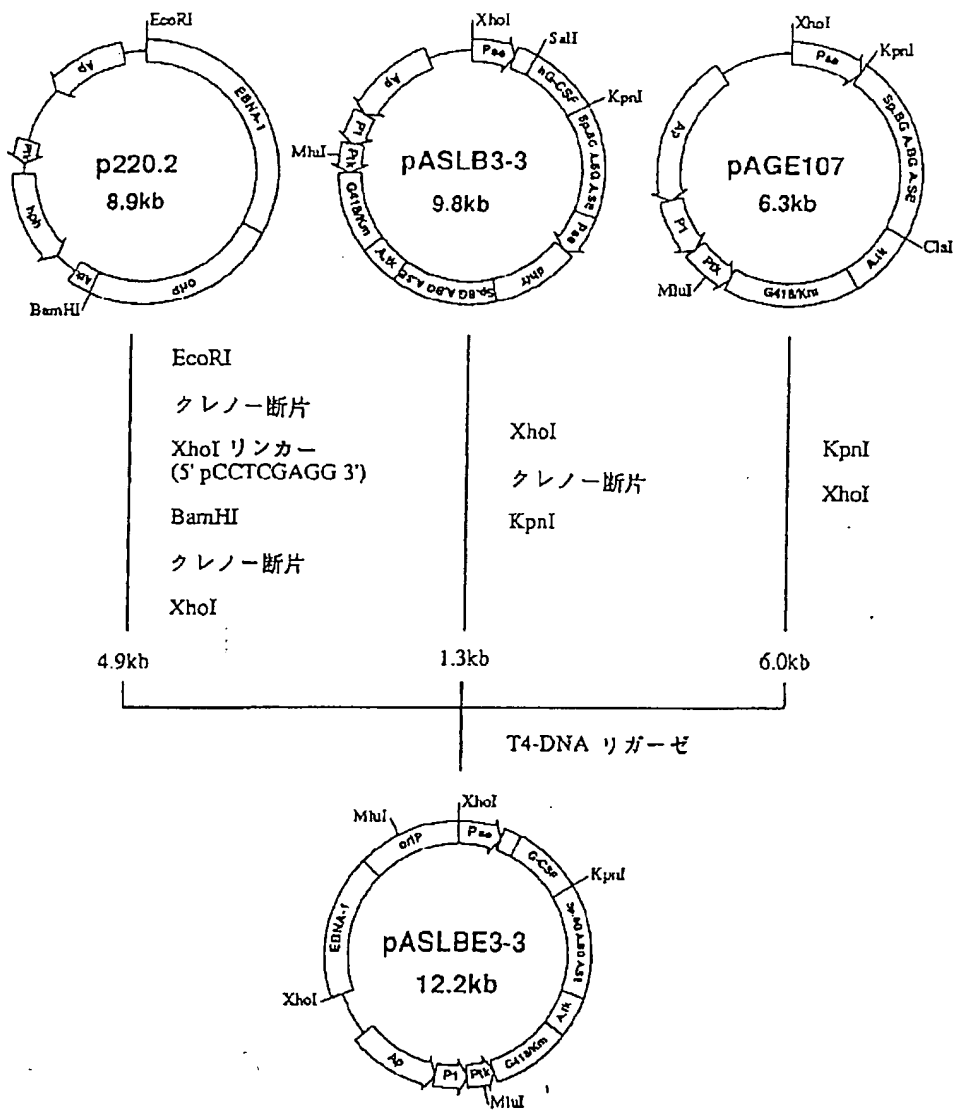
【図 2】



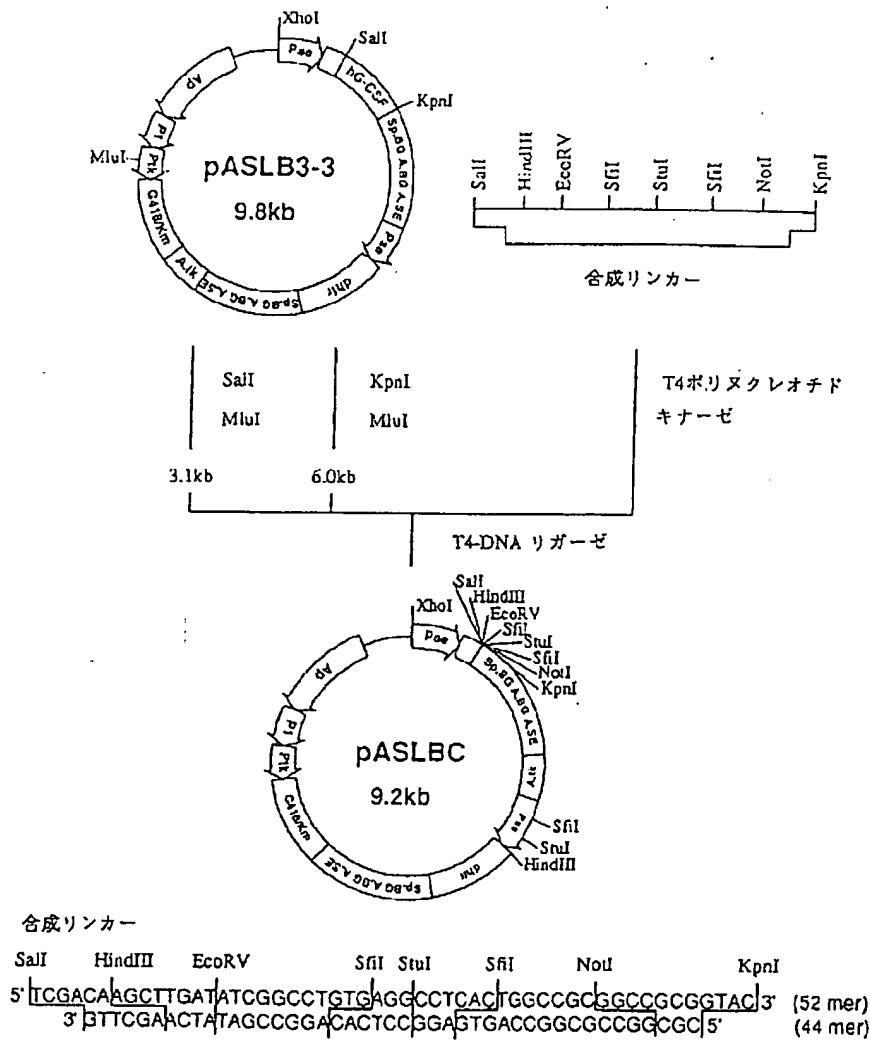
【図3】



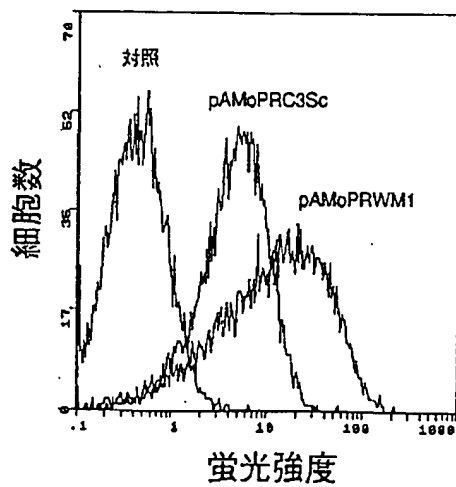
【図4】



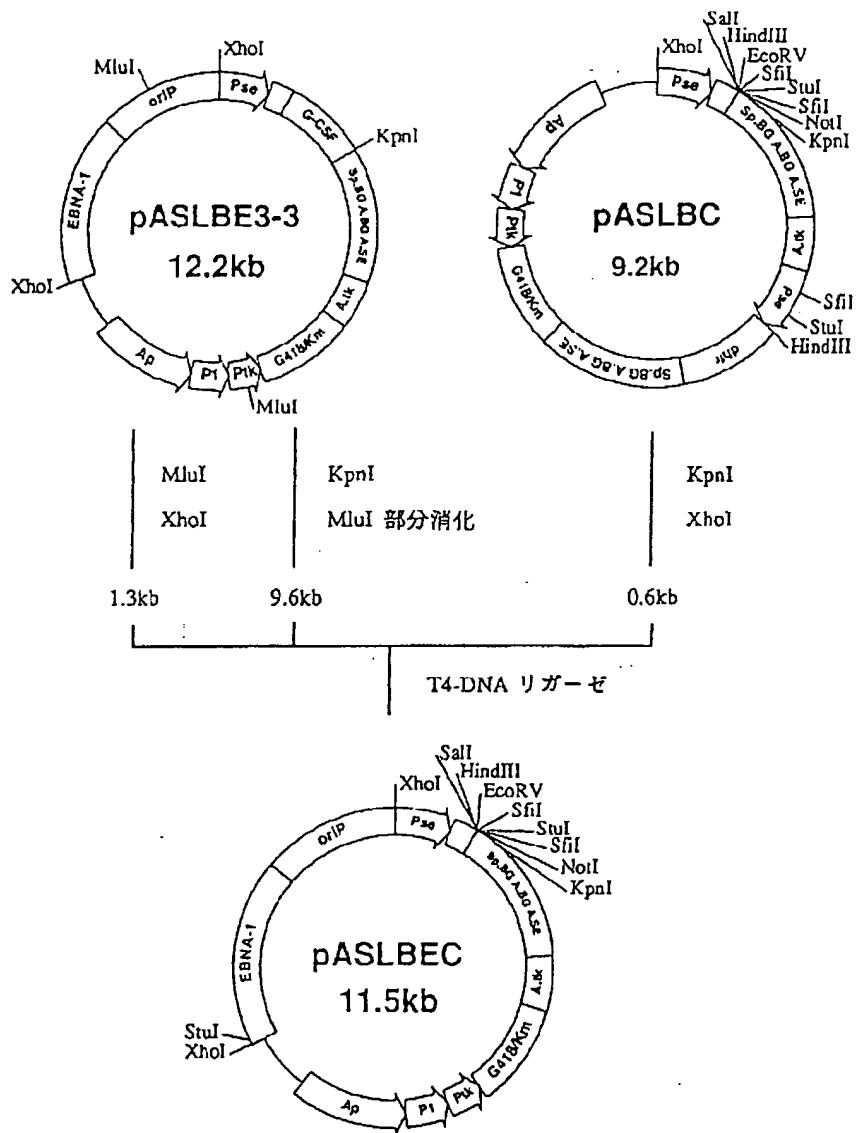
【図5】



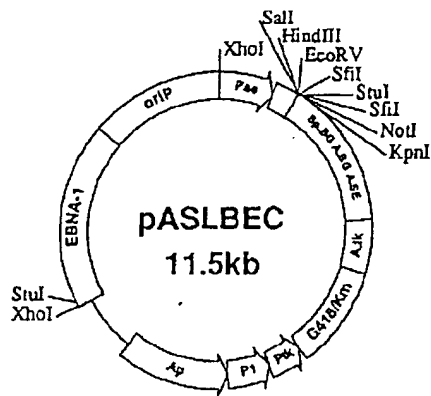
【図23】



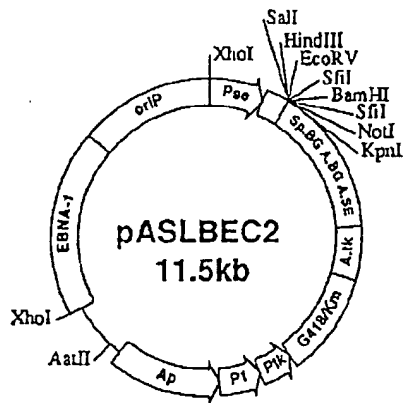
【図6】



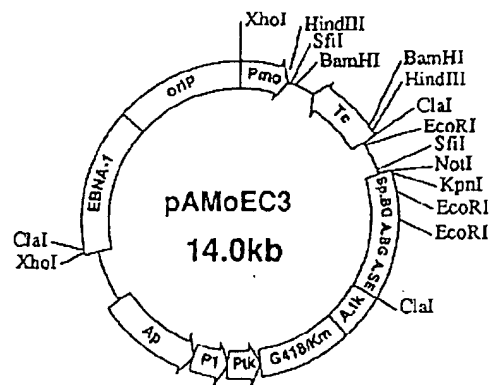
【図7】



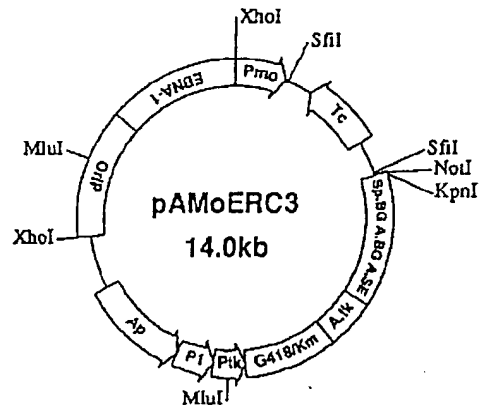
StuI 部分消化
11.5kb
BamHI リンカー
(5' pCCGGATCCGG 3')
BamHI
11.5kb
T4-DNA リガーゼ



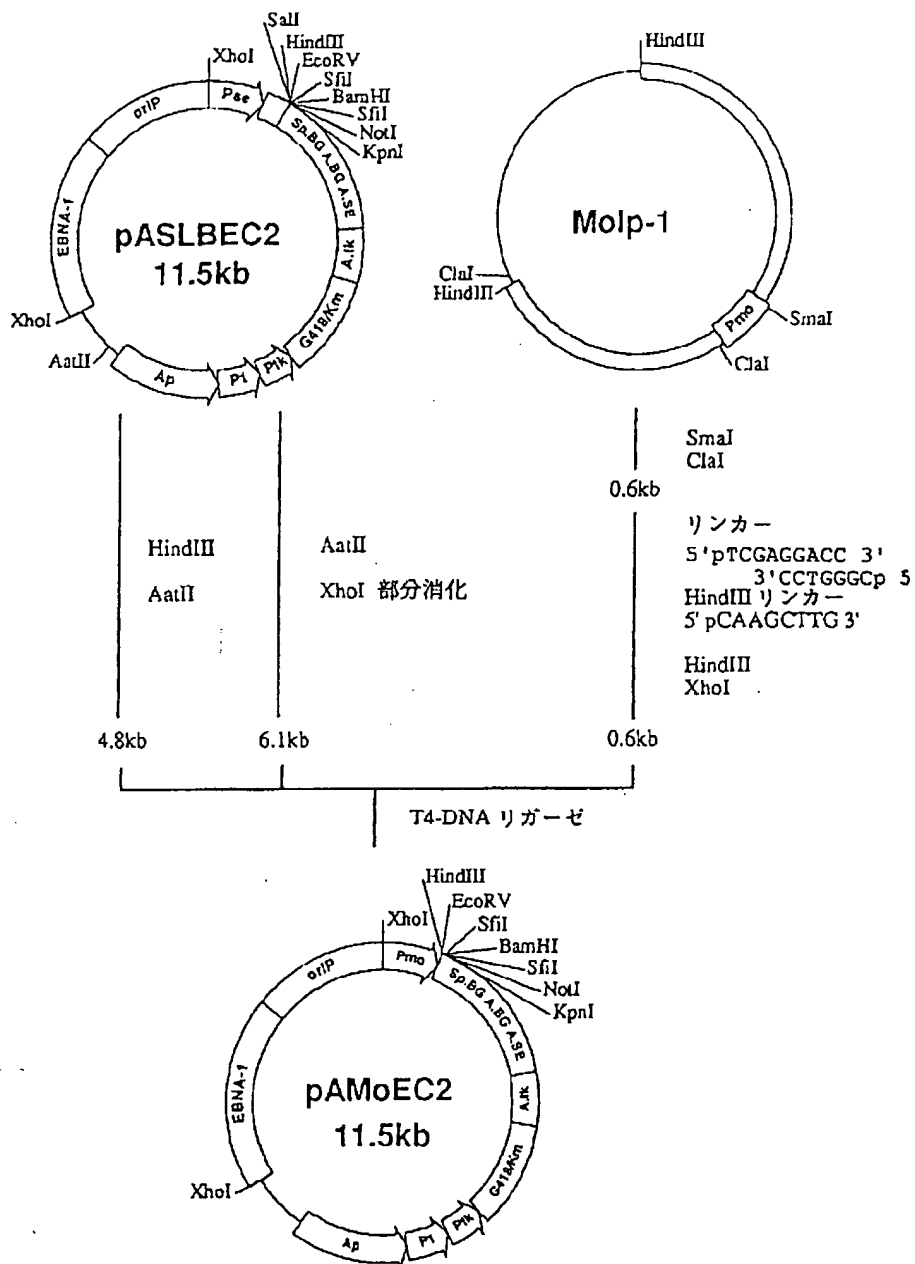
【図10】



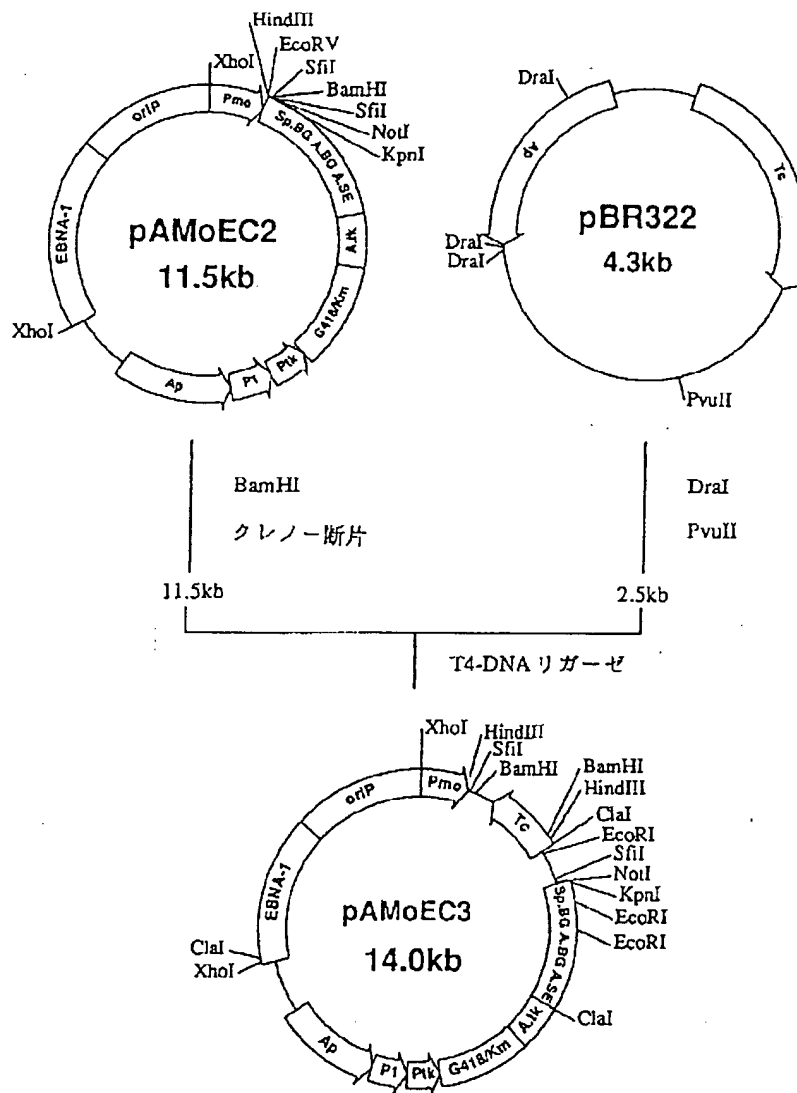
XhoI XhoI
アルカリ
フォスファターゼ
9.1kb 4.9kb
T4-DNA リガーゼ



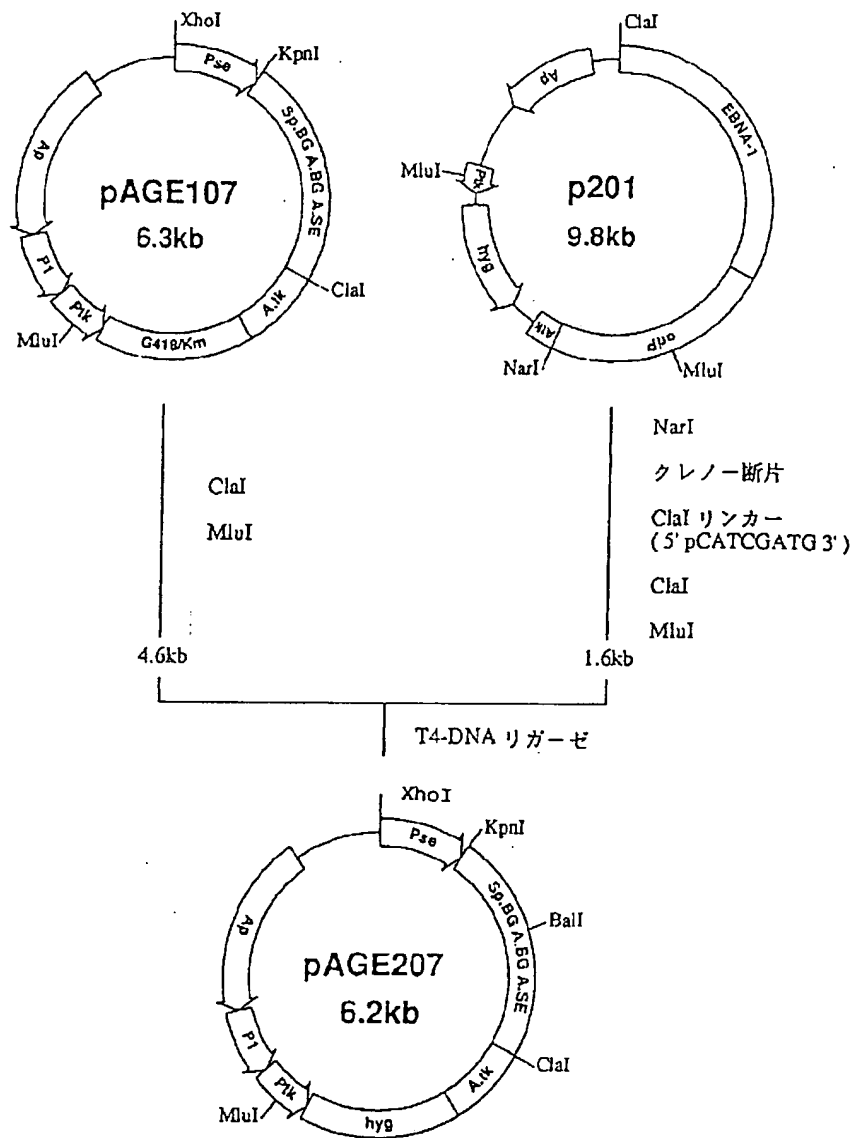
【图 8】



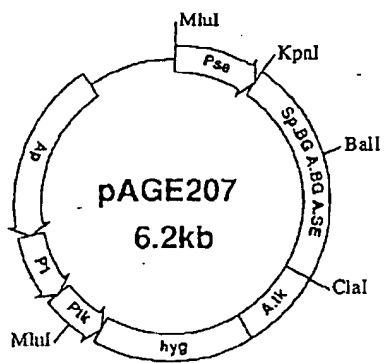
【図9】



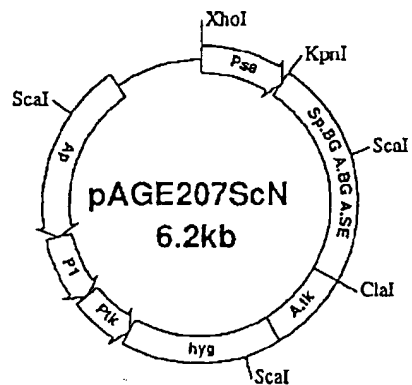
【図11】



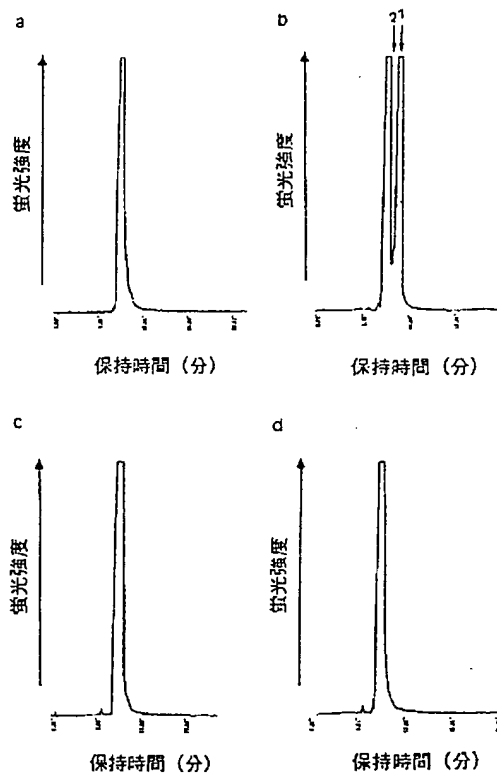
【図12】



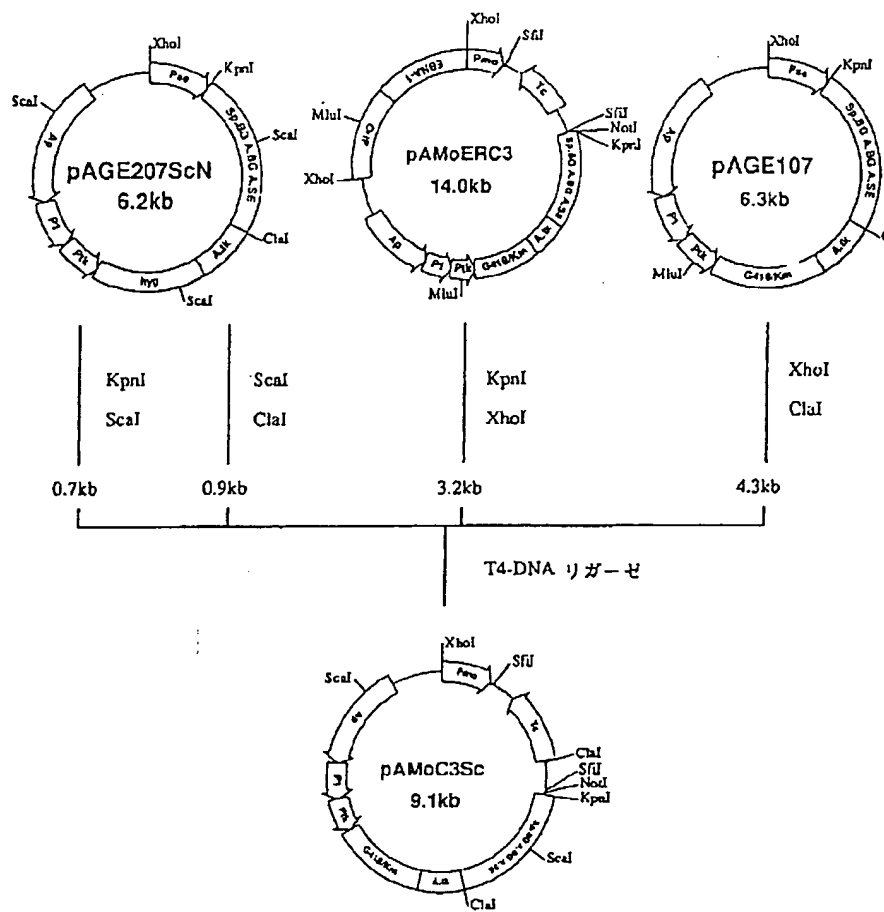
Ball
ScaI リンカー
(5' pAAGTACTT 3')
T4-DNA リガーゼ



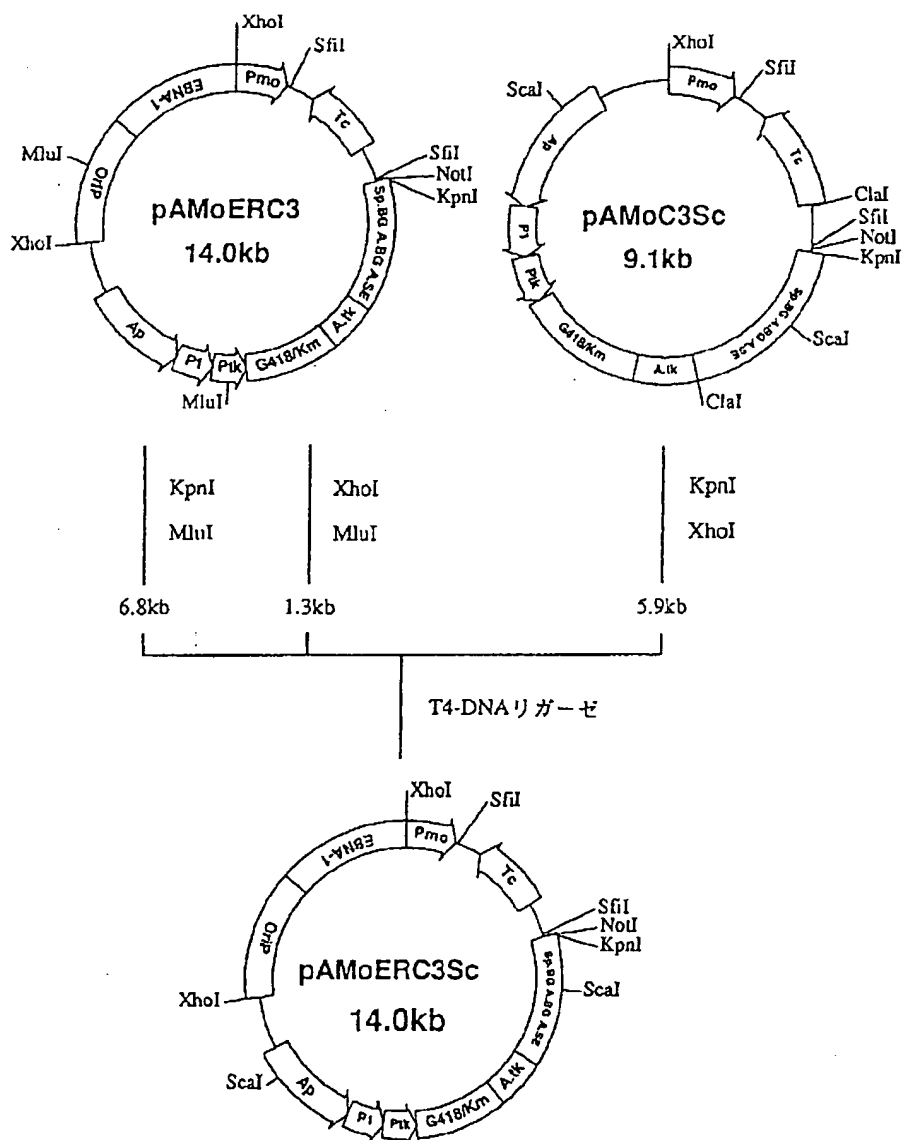
【図22】



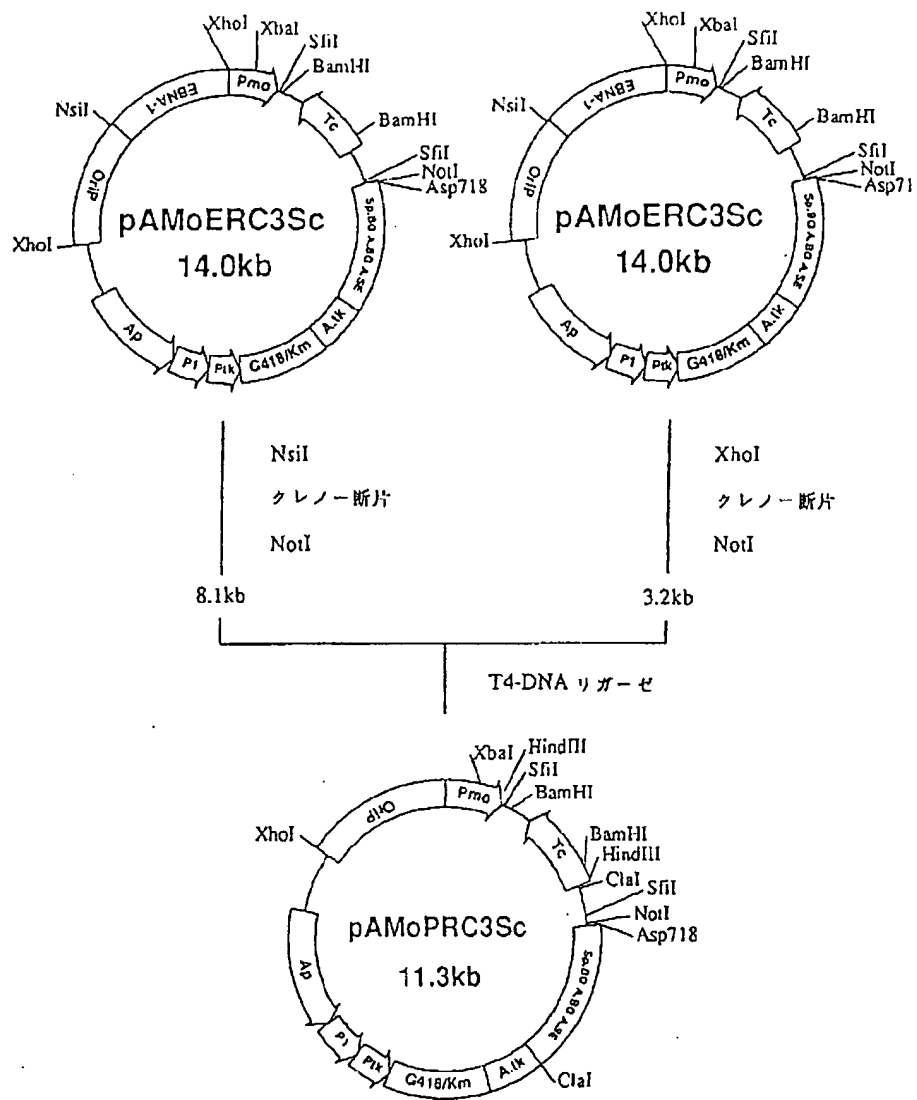
【図13】



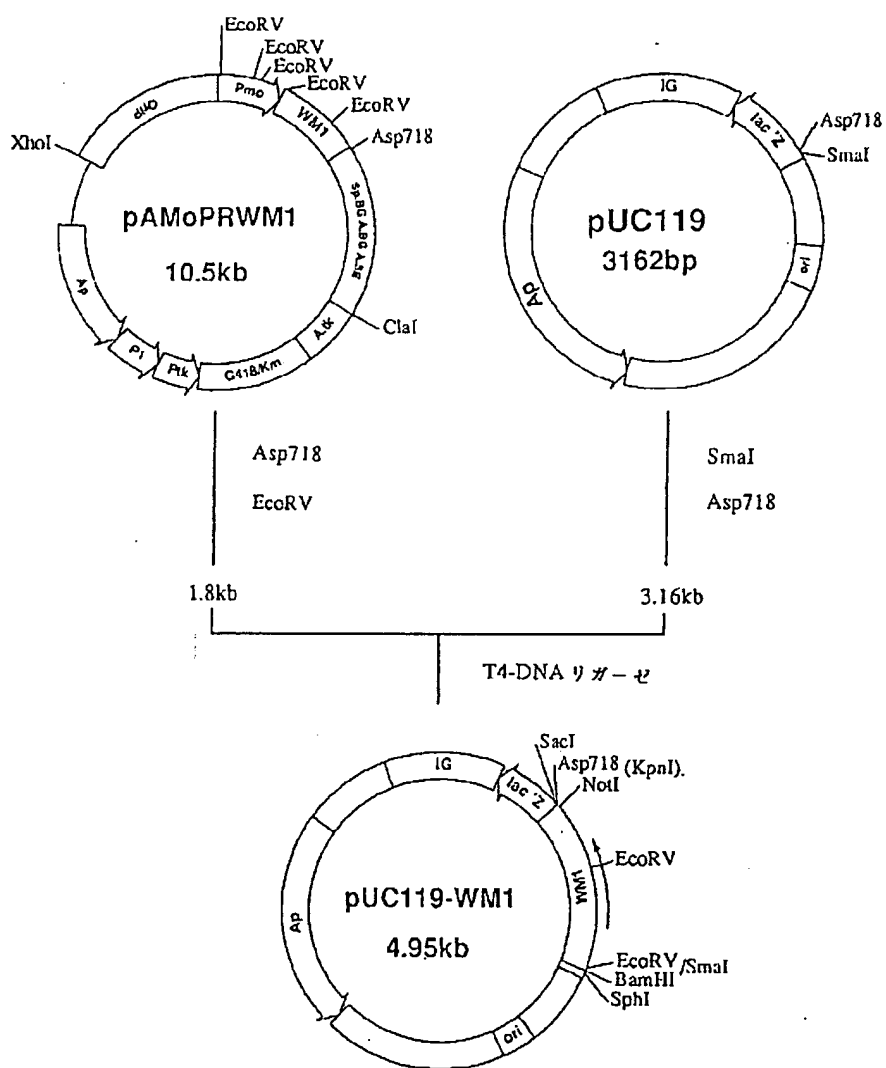
【図14】



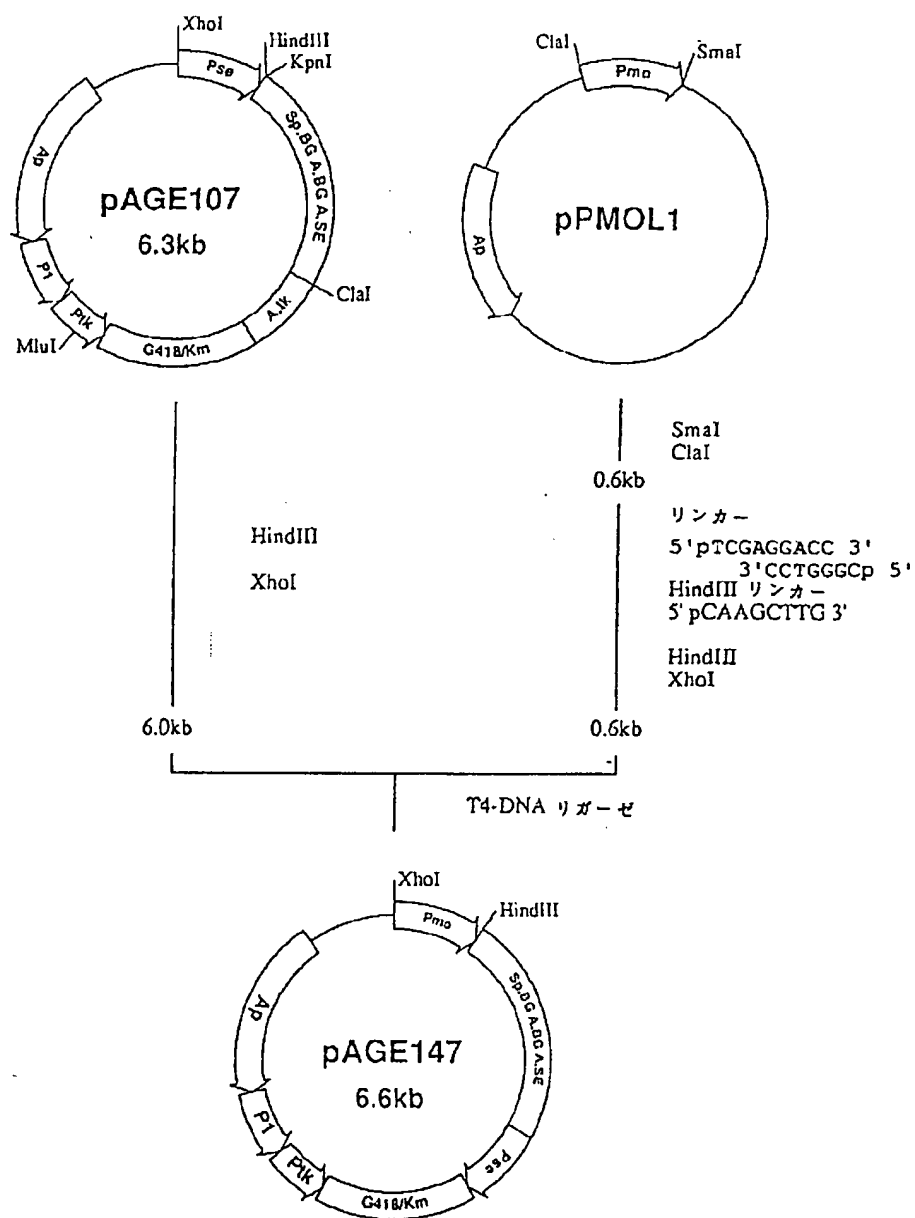
【図15】



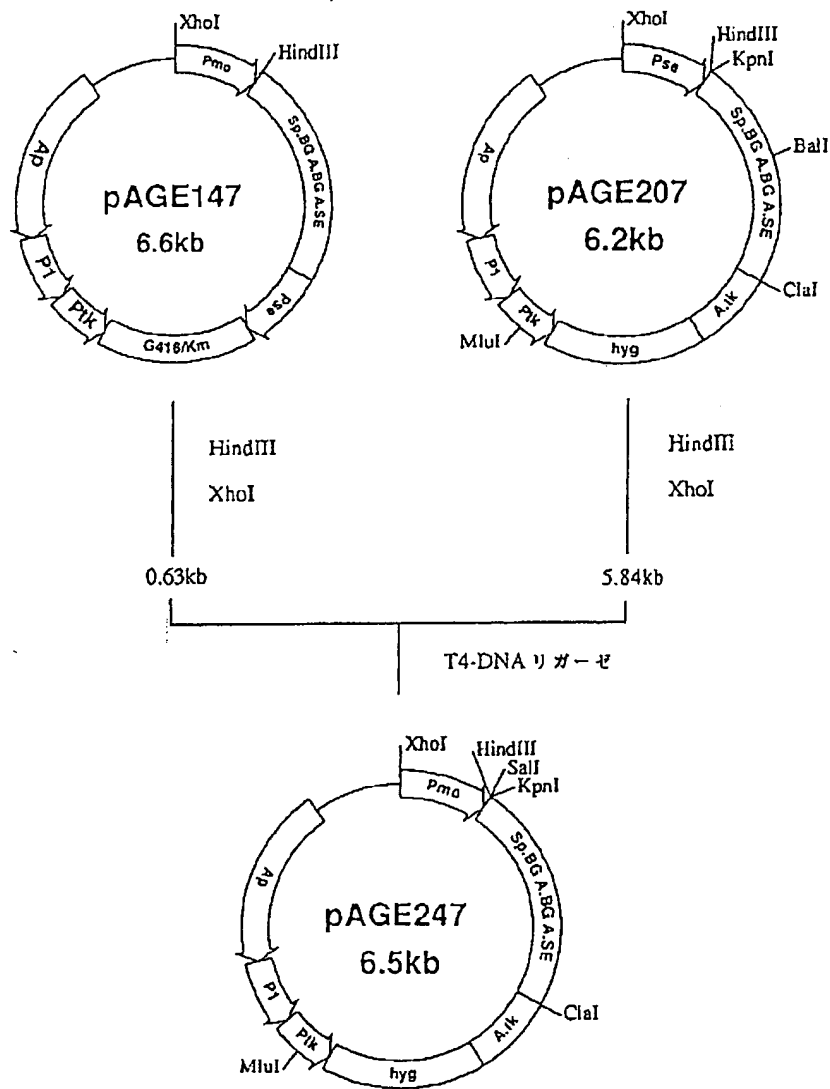
【図16】



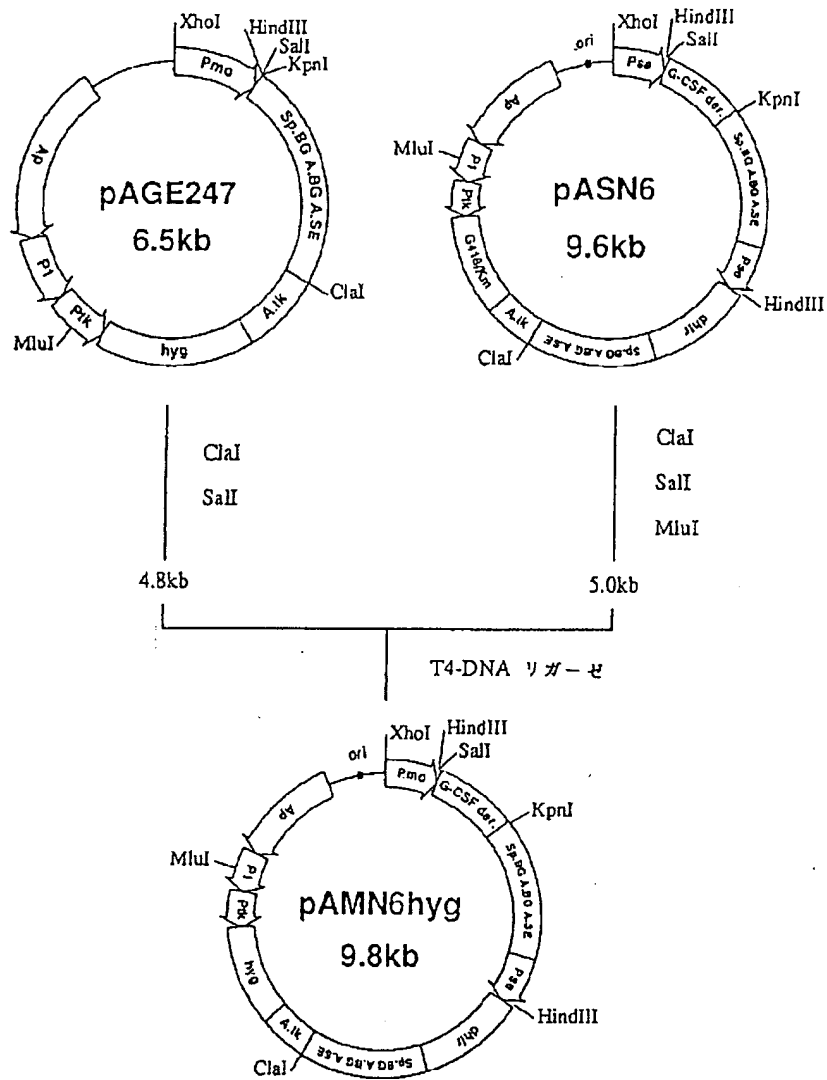
【図17】



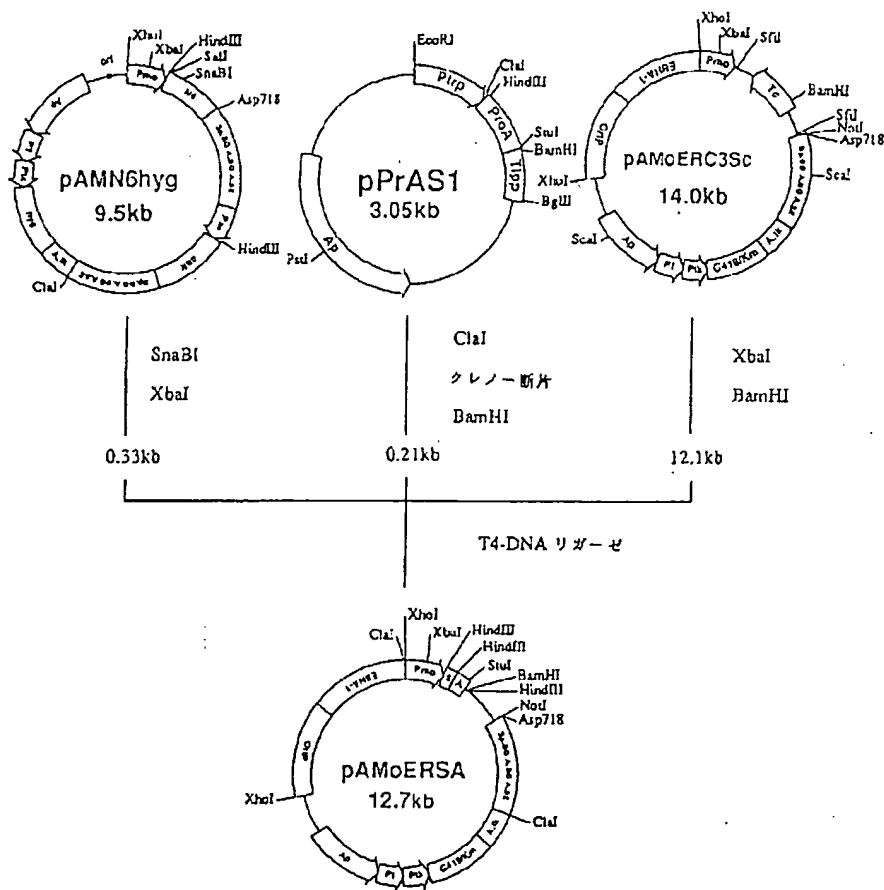
【図 18】



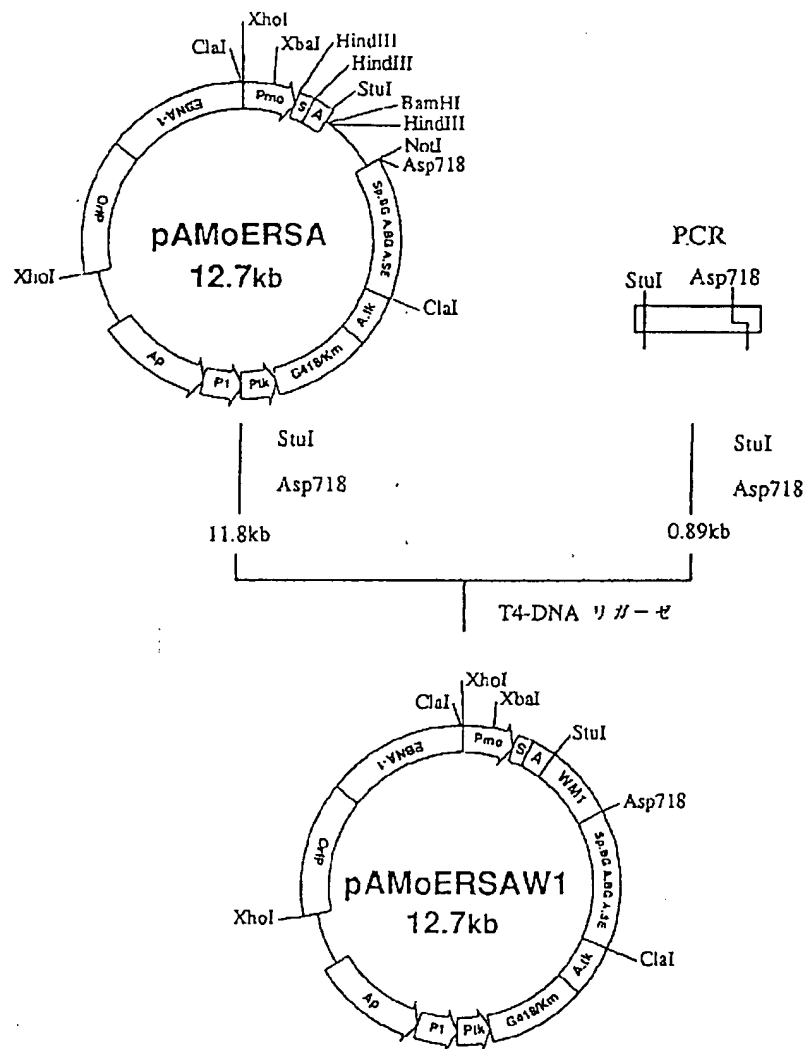
【図19】



【図20】



【図21】



—フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 19/18

7432-4B

C 1 2 Q 1/68

A 7823-4B

// (C 1 2 N 9/10

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 19/18

C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 長谷川 謨
神奈川県川崎市麻生区片平1-9-26